

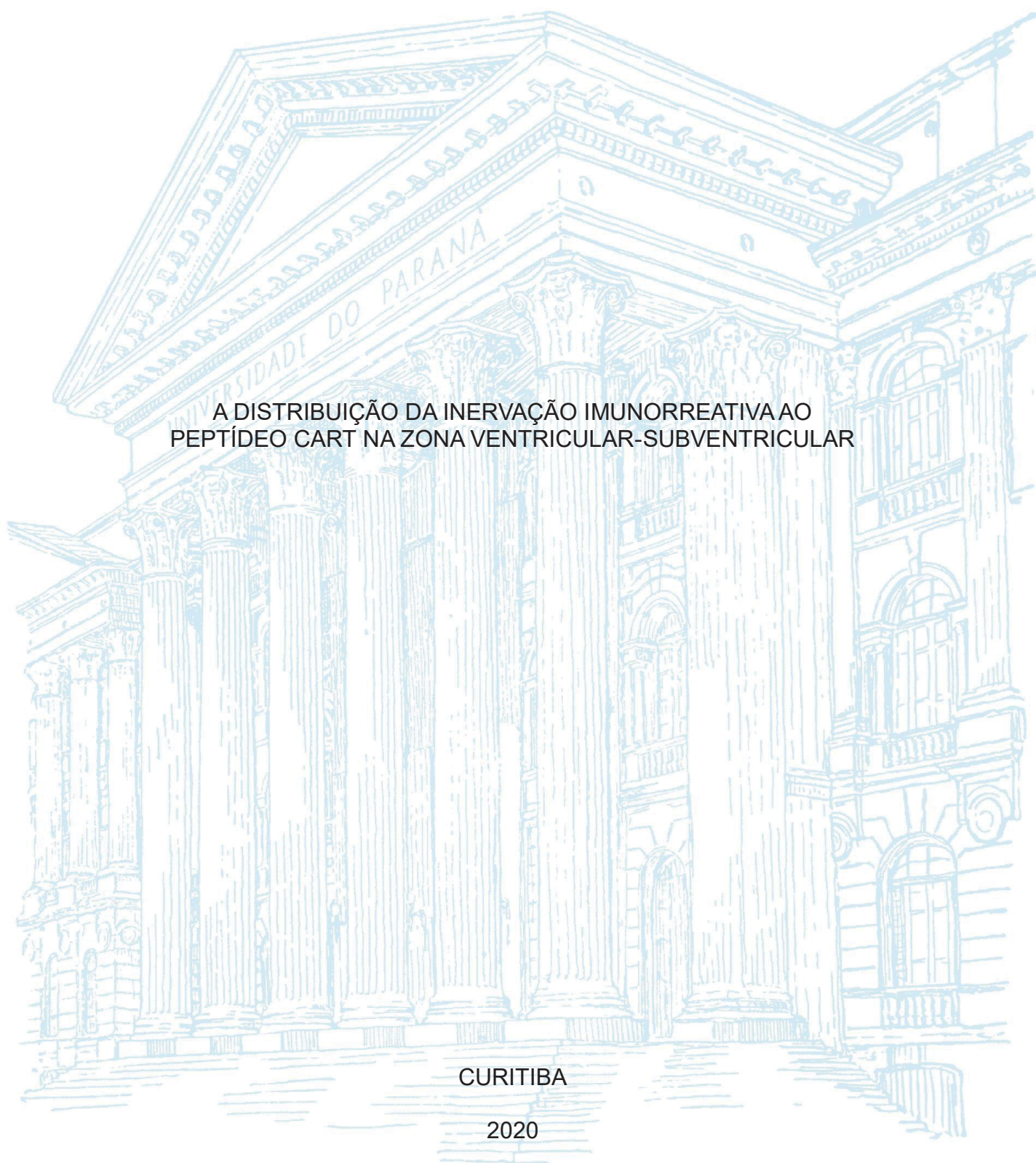
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODRIGO ZOVIA ZARUGNER

A DISTRIBUIÇÃO DA INERVAÇÃO IMUNORREATIVA AO  
PEPTÍDEO CART NA ZONA VENTRICULAR-SUBVENTRICULAR

CURITIBA

2020



RODRIGO ZOVIA ZARUGNER

A DISTRIBUIÇÃO DA INERVAÇÃO IMUNORREATIVA AO  
PEPTÍDEO CART NA ZONA VENTRICULAR-SUBVENTRICULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre dos S. Haemmerle

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Zarugner, Rodrigo Zovia

A distribuição da inervação imuno-reativa ao peptídeo CART na zona ventricular-subventricular. / Rodrigo Zovia Zarugner. – Curitiba, 2020.  
65 p.: il.

Orientador: Carlos Alexandre dos S. Haemmerle

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Neurogênese. 2. Axônios. 3. Imunohistoquímica. I. Título. II. Haemmerle, Carlos Alexandre dos Santos, 1982-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 611.0188



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - 40001016007P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RODRIGO ZOVIA ZARUGNER** intitulada: **A DISTRIBUIÇÃO DA INERVAÇÃO IMUNORREATIVA AO PEPTÍDEO CART NA ZONA VENTRICULAR-SUBVENTRICULAR**, sob orientação do Prof. Dr. CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Julho de 2020.

Assinatura Eletrônica

10/07/2020 15:21:12.0

CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

13/07/2020 17:30:07.0

SILVIA HONDA TAKADA

Avaliador Externo (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC)

Assinatura Eletrônica

14/07/2020 10:48:02.0

CLAUDIO DA CUNHA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

A caminhada até o final do mestrado foi certamente uma experiência singular, com altos e baixos que fizeram-me crescer como pessoa, mas parte desse crescimento advém da companhia de dezena de pessoas que acompanharam de perto ou à distância as minhas angustias, sorrisos, frustrações e realizações. Portanto, tentarei incluir algumas pessoas que fizeram parte desse processo árduo, mas satisfatório.

Agradeço primeiramente ao LME, laboratório cheio de gente maravilhosa, as quais me acolheram e fizeram parte de uma rotina de novos aprendizados e experiências. É um laboratório grande, com muitas pessoas, onde pude encontrar aquelas com que acabei criando uma maior afinidade e que conhecem melhor o meu jeito, meus devaneios, meus comentários absurdos, o meu eu, que no fim acabou gerando até o verbo “rodrigar”. Não gosto de ficar especificando nomes, pois me dá a sensação de estar fazendo uma escala em ordem decrescente das mais importantes para as menos especiais, o que não seria verdade pois cada pessoa foi única de um jeito, algumas ganharam meu coração mais rápido e sabem quem são, afinal eu me acho uma pessoa bem transparente nesse sentido (além de que a descrição detalhada de cada uma iria ser uma grande jornada, já que ainda tenho que trabalhar no meu defeito de não conseguir resumir tão bem, tanto na escrita como verbalmente). Sem dúvidas foram pessoas que tornavam meus dias mais fáceis de serem absorvidos, e imerso nesse ambiente acolhedor e descontraído formei vários amigos, tive muitos aprendizados e experiências muito valiosas.

Foi um mundinho que queria muito explorar, e portanto agradeço a Andrea Senff Ribeiro por me oferecer essa oportunidade e ser uma figura importante para o meu progresso como acadêmico e cientista, mas logicamente, todo o laboratório teve uma participação nessa evolução. Nelesempre tentei explorar de cada pessoinha quando queria debater algum tópico, quando precisava de alguma ajuda ou sair de algum sufoco, e assim tentava extrair pelo menos um pouco da experiência de cada um, a qual sempre ouvia com atenção e maior consideração, apesar do meu jeito teimoso. Houve figuras como a Anto, a Kamila e a Mari que eu chegava a ter dó de tanto



que eu fiquei em cima e que me ajudaram nas inúmeras técnicas novas que eu aprendi e que me orientaram nas diversas etapas, inclusive no laborioso cultivo celular (que certamente foi estressante) e as quais têm minha gratidão.

Agradeço ao Carlos Alexandre dos S. Haemmerle, que disponibilizou e me incluiu em seu espaço, e que com seu carisma, atenção e paciência adicionou ainda mais para minha bagagem de experiências, despertou uma curiosidade adormecida sobre a neurologia, e que somado com o período de experiência com a Andrea me encheram de conselhos que eu vou levar para o resto da minha vida, pois sei que tiveram a única intenção de fazer de mim um melhor profissional, para que no futuro eu tenha menos e menos problemas. Claro que vale lembrar a companhia da Gabi, uma menina encantadora que me ajudou muito nesse último ano, que sempre se mostrou preocupada comigo, que junto com a turma de Fisioterapia me lembraram o amor que sempre tive pela bioquímica.

Não posso esquecer da minha família, que são a minha fortaleza para continuar batalhando e não desistir. Temos algumas dificuldades e impasses, mas minha admiração que tenho por vocês é indescritível, me espelho muito no ser humano que vocês são para mim, e que sem dúvida são uma parte essencial desse processo. Muito obrigado ao meu pai Waldemiro Zarugner, minha mãe Lindacir Zovia, e ao meu irmãozinho Felipe Zovia Zarugner, vocês são muito especiais para mim. Amo vocês.

Não posso me esquecer da minha companheira Thais Zink, que esteve comigo lá desde o início, que me apoiava nas minhas decisões, que me dava broncas (mas que eu sabia que eram para meu bem). Era o meu cantinho para esquecer um pouco de todo o meu estresse e angústias, era a vizinha que dizia que tudo ia ficar bem e que trazia paz e tirava de mim um sorriso nas horas mais complicadas. Te amo e obrigado por tudo nesses últimos anos.

Por fim, um agradecimento a todos os outros amigos meus, que não acompanharam minha vida laboratorial de pertinho, mas que trouxeram vários momentos bons e um ar de leveza que sem dúvida foi importantíssimo para mim, pois me faziam lembrar que eu não estava sozinho, que eu não preciso enfrentar nada sozinho, e que sempre vou ter pessoas em que eu posso contar. Um último e sincero muito obrigado.

“E não menos que saber, duvidar me agrada.”  
Dante Alighieri, retirado do livro *Divina comédia*.

## RESUMO

O transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) é um neuropeptídeo com ampla presença no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Com a identificação e o mapeamento de sua distribuição, houve um grande interesse sobre sua função e mecanismo de ação nos diferentes núcleos e áreas onde o CART era descrito. A localização de corpos neuronais e/ou fibras axonais imunorreativas (ir) ao CART em regiões dos sistemas límbico, sensoriomotor e vegetativo sugerem uma participação em funções locais específicas e enfatizam sua complexidade e ação como agente regulador. Evidências apontam diversas funções para esse peptídeo como modulador de comportamentos e ações como: estresse e ansiedade, alimentação, cognição, dependência química, desenvolvimento e proliferação neural. Em relação às duas últimas características, sabe-se que a região da zona ventricular-subventricular (V-SVZ) do ventrículo lateral é innervada por axônios ir-CART e exibe diferentes populações de precursores neurais remanescentes do período embrionário, os quais se mantêm ativos durante toda a vida. Com isto, objetivamos mapear os axônios ir-CART e quantificar sua distribuição neuroanatômica na V-SVZ, analisando possíveis sinapses ou aposições entre os terminais ir-CART e as células da região. Utilizamos encéfalos previamente preparados e removidos de ratos adultos machos da linhagem Long-Evans, sob protocolo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa de acordo com o CONCEA. As amostras foram submetidas a protocolos de marcação imunoistoquímica simples ou duplas, por métodos de peroxidase ou fluorescência, utilizando-se anticorpos anti-CART, anti-DARPP32 e anti-vimentina, sob concentrações específicas. As quantificações da marcação anti-CART utilizaram dados de conversão em pixels fornecidos pelo plugin FeatureJ do programa ImageJ, seguindo protocolo adaptado e validado que demonstraram ser uma quantificação semi-automática eficiente. Encontramos a maior densidade de innervação ir-CART nos territórios medial e ventral da V-SVZ, cujas médias densitométricas foram de 5 a 10 vezes maiores comparado aos territórios lateral e dorsolateral ao longo do eixo anteroposterior, além da presença de aposições entre terminais ir-CART, células endoteliais e estriatais imunomarcadas por DARPP32. Com isso, oferecemos uma abordagem neuroanatômica que amplia dados funcionais e fisiológicos da ação do CART relacionada a uma possível formação de novos neurônios dentro do território da SVZ.

**Palavras-chave:** neurogênese; axônio; imunoistoquímica



## ABSTRACT

The cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) is a neuropeptide with a wide presence on mammal central nervous system (CNS), distributed all over the neuroaxis. This feature drew a huge interest over its function and mechanism of action on different nuclei and areas where it was described. The localization of neuron cell bodies and/or immunoreactive (ir) CART fibers on regions of the limbic, motor, vegetative and sensory systems suggest its participation on specific local functions, thereby it highlights CART complexity and variability as a regulator agent. Evidences point out several functions for this peptide as a modulator of behavior and actions such as: stress and anxiety, feeding, cognition, drug addiction, neural development and proliferation. Regarding of the last two features, it is known that the ventricular/subventricular zone (V-SVZ) of the lateral ventricle is innervated by immunoreactive (ir)-CART axons and exhibit different populations of reminiscent neural precursors from the embryonic stage, which are kept active throughout the entire lifetime. Thus we objective to track the ir-CART fibers and quantify its neuroanatomic distribution on the V-SVZ, in order to analyze feasible synapses or appositions between the ir-CART terminals and local cells. We used brains previously prepared and removed from adult male Long-Evans rats, under approved protocol by the ethics committee according to CONCEA legislation. The samples were submitted to single and double immunostaining protocols using fluorescence and peroxidase techniques whereas anti-CART, anti-DARPP32 and anti-Vimentin antibodies were used under specific concentrations. The data obtained for the quantification of ir-CART immunostaining was given in pixel units, measured after application of the hessian filter found on FeatureJ plugin, which is available for download and usage on Fiji, following an adapted and validated protocol which demonstrated to be an efficient semi-automated quantification. It was observed a higher density of ir-CART fibers on medial and ventral territories of the V-SVZ, which happened to be 5 to 10 fold the densitometry of the lateral and dorsolateral counterparts along the anteroposterior axis. Besides that it was also noticed the presence of possible appositions between the ir-CART terminals and ependymal cells and DARPP32 positive striatal cells bodies. Thereby we offer a neuroanatomic approach that amplify the functional and physiological data over a possible existence of a relationship between the CART neuropeptide and neurogenesis on the V-SVZ territory.

Key words: **neurogenesis; axon; immunohistochemistry**

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DO PEPTÍDEO CART EM DIFERENTES REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	19
FIGURA 2. CONDICIONAMENTO E REFORÇO DA AÇÃO APÓS AUTO-ADMINISTRAÇÃO E MICROINFUSÃO DE CART EM RELAÇÃO AO CONTROLE.....	24
FIGURA 3. ESQUEMATIZAÇÃO E REPRESENTAÇÃO DA V-SVZ E SUAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE CÉLULAS.....	25
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO VISUAL DA INERVAÇÃO IR-CART NOS QUATRO DOMÍNIOS DA V-SVZ.....	36
FIGURA 5. SEQUÊNCIA DE PASSOS DA METODOLOGIA SEMI-AUTOMÁTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DENSITOMÉTRICA DAS FIBRAS IR-CART PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA PELO MÉTODO PEROXIDASE-DAB.....	37
FIGURA 6. ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE DUPLA MARCAÇÃO PARA CART E DARPP32.....	40
FIGURA 7. ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE DUPLA MARCAÇÃO PARA CART E VIMENTINA.....	42

## **LISTA DE GRÁFICOS**

GRÁFICO 1- QUANTIFICAÇÃO DENSITOMÉTRICA DA INERVAÇÃO DE FIBRAS IR-CART PARA OS QUATRO DOMÍNIOS DA SVZ .....	38
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Alfa-SMA: Alfa actina do músculo liso	GAP43: Proteína associada ao crescimento 43
Acb: Núcleo <i>accumbens</i>	Ig: Imunoglobulina
AcbC: Região <i>core</i> do Núcleo <i>Accumbens</i>	LS: Núcleo septal lateral
AcbSh: Região <i>shell</i> do Núcleo <i>Accumbens</i>	NIDA: Instituto Nacional de Abuso de Drogas
AMPc: Adenosina monofosfato cíclico	NSDUH: Pesquisa Nacional em Uso de Drogas e Saúde
BrdU: 5-Bromo-2-deoxiuridina	PBS: Solução de fosfato de potássio monobásico tamponada em salina
CalB: Calbindina	PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
CalR: Calretinina	PPX: Pramipexol
CART: Transcrito regulado por cocaína e anfetamina	SDF-1: Fator-1 derivado de células stromais
cc: Corpo caloso	SFi: Núcleo septofimbrial
CEBRID: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas	SGZ: Zona Subgranular
CP: Caudado Putâme	SNC: Sistema Nervoso Central
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	SNP: Sistema Nervoso Periférico
CREB: Proteína de ligação ao elemento responsivo de AMPc	SVZ: Zona Subventricular
Cy3: Cianina 3	TH: Tirosina Hidroxilase
DAB: Diaminobenzidina	UNODC: Escritório das Nações Unidas em drogas e crimes
DARPP32: Fosfoproteína regulada por AMPc e Dopamina	VL: Ventrículo lateral
DDRT-PCR: Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa de exibição diferencial	V-SVZ: Zona Ventricular-Subventricular
DPX: <i>Distrene</i> , Plastificante e Xileno	VTa: Área Tegmentar Ventral
FITC: Isotiocianato de fluoresceína	

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1.    Objetivo geral.....	17
2.2.    Objetivos específicos.....	17
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
3.1.    CART.....	18
3.2.    CART: receptor.....	20
3.3.    CART: Gene e proteína.....	21
3.4.    CART: Distribuição neuroanatômica.....	22
3.4.1. Núcleo accumbens.....	22
3.4.2. Zona ventricular/Subventricular (V-SVZ) .....	24
3.5.    CART: Epidemiologia e justificativa.....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1.    Animais.....	30
4.2.    Preparações e processamento dos tecidos.....	30
4.3.    Imunoistoquímica para o CART: Método da peroxidase/DAB combinado com o método de intensificação por prata.....	31
4.4.    Imunofluorescência.....	32
4.5.    Método de coloração de Giemsa.....	32
4.6.    Aquisição, processamento e análise das imagens.....	33
4.6.1. Quantificação semi-automática.....	33
4.7.    Análise estatística .....	34
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1.    Quantificação da inervação de fibras CART imunorreativas.....	35
5.2.    Ensaio de Imunofluorescência de dupla marcação para CART e DARPP32.....	38
5.3.    Ensaio de imunofluorescência de dupla marcação para CART e vimentina.....	41
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
6.1.    Inervação de axônios ir-CART nos domínios da V-SVZ.....	43
6.2.    CART e DARPP32.....	46
6.3.    CART e Vimentina.....	49
6.4.    Análise anatomofuncional e neurogênese.....	51

6.5. Considerações finais.....	53
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O CART (cocaine-and-amphetamine regulated transcript) é um neuropeptídeo envolvido em múltiplos processos fisiológicos, e por isso, amplamente distribuído em diversas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008; ZHANG; HAN; XU, 2012). O acrônimo surgiu do experimento de Douglass *et al.* (1995), que ao avaliar a plasticidade neuronal causada pela administração crônica ou aguda de cocaína e anfetamina, relatou um aumento de um RNAm no estriado de ratos após a administração aguda desses psicoestimulantes. Contudo, anteriormente a essa data, um fragmento peptídico desconhecido havia sido isolado do hipotálamo de ovinos por Spiess *et al.* (1981), cuja sequência aminoacídica curiosamente correspondia parcialmente ao RNAm CART descrito por Douglas *et al.* (1995). Isso revelou um primeiro indicativo da tradução do transcrito CART.

Desde sua primeira descrição, os estudos demonstraram diferentes co-localizações de neurônios/fibras CART com um variado número de moléculas dentro do sistema nervoso (SUBHEDAR; NAKHATE; UPADHYA; KOKARE, 2014). A localização do CART em diferentes núcleos do neuro-eixo e também a conservação evolutiva da sua sequência de bases entre as espécies são características que enaltecem um papel crucial desse peptídeo (ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008). Fisiologicamente, o CART representa o terceiro RNAm mais abundante no hipotálamo (GAUTVIK; DE LECEA; GAUTVIK; DANIELSON *et al.*, 1996) e além disso, níveis aumentados de RNAm CART foram encontrados também no núcleo accumbens de vítimas de overdose por cocaína (ALBERTSON; PRUETZ; SCHMIDT; KUHN *et al.*, 2004). Ademais, há evidências de correlação do CART com: estresse, ansiedade, depressão, apetite e dependência química (KUHAR; JAWORSKI; HUBERT; PHILPOT *et al.*, 2005; LAU; HERZOG, 2014; MAO, 2011; MENG; KIM; OH; LEE *et al.*, 2018) o que realça sua diversidade funcional e a importância de explorar seus potenciais funcionais e terapêuticos.

A marcação imunorreativa ao CART é profusa e evidente dentro dos sistemas mesolímbico e mesoestriatal dopaminérgicos (KOYLU; COUCEYRO;

LAMBERT; KUHAR, 1998), os quais são associados com o reforço/recompensa, cuja desregulação pode conduzir à dependência, compulsão alimentar e déficits no aprendizado motor a uma tarefa específica (DELONG; WICHMANN, 2009; GRACE, 2016). E dentro desses sistemas há regiões e núcleos como o estriado e o núcleo *accumbens* que estão parcialmente inseridos em territórios onde residem precursores neurais específicos para a formação de novos neurônios do bulbo olfatório: a zona ventricular-subventricular (V-SVZ) (DOETSCH; CAILLÉ; LIM; GARCÍA-VERDUGO *et al.*, 1999; MERKLE; FUENTEALBA; SANDERS; MAGNO *et al.*, 2014).

Com isso, nossa proposta envolve investigar a distribuição do CART na V-SVZ e possíveis contatos de suas projeções com demais células dessa região. Deste modo, seria possível sugerir sua ação moduladora em alguma etapa da neurogênese adulta em roedores, colaborando assim na compreensão e ampliação de sua caracterização funcional.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Mapear os axônios ir-CART dentro dos domínios da V-SVZ.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Quantificar a distribuição dos axônios, em relação à área de cada domínio da V-SVZ;
- Comparar as quantificações entre os domínios ao longo do eixo ânteroposterior;
- Investigar prováveis aposições/sinapses dos axônios e/ou terminais ir-CART com células próprias das V-SVZ e as imunorreativas ao DARPP32.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CART

O CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) é um peptídeo neuroativo que possui uma provável ação neuromoduladora ou neurotransmissora. Sua descoberta ocorreu em 1995, por Douglass e colaboradores, que queriam na época investigar a plasticidade neuronal que ocorria após a administração sistêmica de curta e longa duração de estimulantes psicomotores.

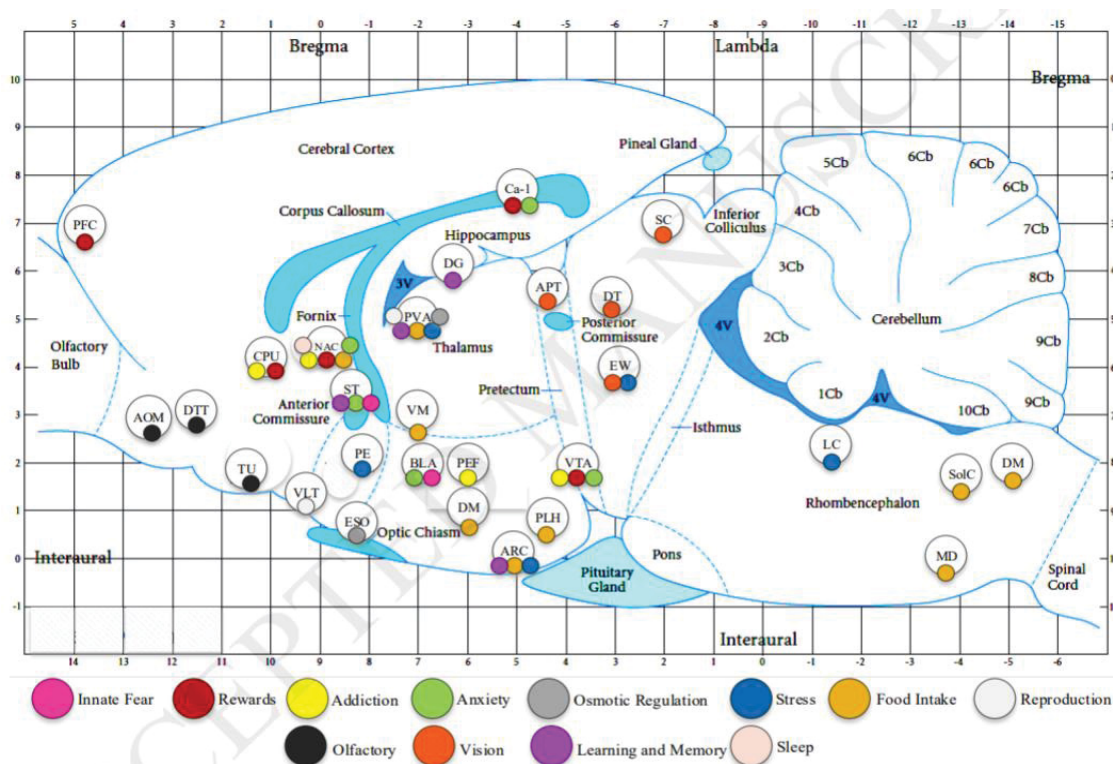
Por meio da técnica de DDRT-PCR, foi realizado um screening do RNAm em algumas regiões cerebrais específicas para observar diferenças no seu padrão de expressão após a administração aguda de cocaína ou anfetamina. E em apenas uma, dentre as bandas de mais de 12.000 produtos de PCR que foram gerados, observou-se um aumento de cerca de 5 vezes de seu produto após a exposição ao psicoestimulante. Como o produto relacionado a esta banda era desconhecido até então, este experimento originou o nome do CART - que é o acrônimo para transcrito regulado por cocaína e anfetamina.

Após sua identificação, buscou-se mapear as regiões de síntese e projeção do CART dentro do SNC (FAGERGREN; HURD, 2007). A ampla distribuição desse peptídeo no cérebro de mamíferos foi confirmada por outros grupos de pesquisa, sendo detalhada no eixo hipotálamo-hipofisário de ovinos por Barrett et al. (2002), e também dentro de vesículas densas encontradas em terminações nervosas no núcleo accumbens de macacos, com estudo por microscopia eletrônica de transmissão feito por Smith et al. (1997).

Com o mapeamento em áreas como o córtex frontal, amígdala, bulbo olfatório, hipocampo (MURPHY, 2005), e a classificação do RNAm do CART como o terceiro mais abundante no hipotálamo em ratos (GAUTVIK; DE LECEA; GAUTVIK; DANIELSON *et al.*, 1996), sugeriu-se uma possível participação do CART em diversos comportamentos e funções neurais, como a percepção sensorial, memória e aprendizado, cognição, sistema de recompensa, sono, percepção dolorosa, sistema motivado, entre outros

(KOYLU; COUCEYRO; LAMBERT; KUHAR, 1998; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008; UPADHYA; NAKHATE; KOKARE; SINGH *et al.*, 2012).

FIGURA 1- DISTRIBUIÇÃO DO PEPTÍDEO CART EM DIFERENTES REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL



Demonstração em corte sagital dos diferentes núcleos de um encéfalo de rato em que se sugere haver uma correlação funcional com o peptídeo CART, exemplificando sua abrangência e caráter multifuncional. **FONTE:** (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018)

O CART é um peptídeo neuroativo sintetizado no cérebro exclusivamente em neurônios. Demonstrou-se que sua expressão anômala e/ou desregulada esteja relacionada com desordens no SNC associadas a problemas como obesidade, estresse, depressão, ansiedade, além da dependência química (JAWORSKI; JONES, 2006; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008). Não obstante, uma substituição do aminoácido leucina na posição 34 por uma fenilalanina conduziu a uma possível correlação com a obesidade em humanos (YANIK; DOMINGUEZ; KUHAR; DEL GIUDICE *et al.*, 2006), mutação que parece também ter uma participação na depressão e ansiedade em adolescentes (MIRAGLIA DEL GIUDICE; SANTORO; FIUMANI; DOMINGUEZ *et al.*, 2006). Outrossim, há também uma correlação de um

polimorfismo no intron1 do CART com maiores incidências de alcoolismo (JUNG; HONG; SUH; JIN *et al.*, 2004; KUCHAR; JAWORSKI; HUBERT; PHILPOT *et al.*, 2005).

Com base no contexto acima, a saúde pública pode ser beneficiada com o aprofundamento do entendimento desse peptídeo, cuja possibilidade de uso como alvo terapêutico pode vir a ser considerada no combate e/ou atenuação desses problemas sociais.

### **3.2 CART: receptor**

Existe uma discussão sobre a designação mais apropriada para o CART, no tocante a enquadrá-lo na categoria de neurotransmissor ou neuropeptídeo. Cumprem-se requerimentos necessários que classificam-no dentro da primeira categoria, como sua expressão dentro de neurônios (DOUGLASS; MCKINZIE; COUCEYRO, 1995), empacotamento dentro de vesículas que se apõem a elementos pós-sinápticos (SMITH; KOYLU; COUCEYRO; KUCHAR, 1997), além da existência de um receptor pós-sináptico para propagação do sinal, o que foi primeiramente postulado por Yermolaieva *et. al* (2001) que, pelo cultivo de neurônios do hipocampo presenciou uma longa inibição de canais de voltagem do tipo L modulados por CART, hipótese corroborada em estudos seguintes com a demonstração da ligação e sinalização modulada por CART em receptores na linhagem de células corticotróficas atT20 (LAKATOS; PRINSTER; VICENTIC; HALL *et al.*, 2005; SARKAR; WITTMANN; FEKETE; LECHAN, 2004).

Entretanto, apesar da multifuncionalidade e abrangência do CART, não há uma caracterização definitiva de um receptor neural específico para o CART, nem de seus parceiros moleculares (NAGELOVÁ; PIRNÍK; ŽELEZNÁ; MALETÍNSKÁ, 2014), problema enfrentado devido a uma baixa interação e alta inespecificidade com seu sítio de ligação (SMEDH; SCOTT; MORAN, 2015).

Alguns estudos apontam que o receptor para CART se trata de um receptor acoplado a proteína G (provavelmente Gi) (KUCHAR, 2016; LAKATOS; PRINSTER; VICENTIC; HALL *et al.*, 2005; YERMOLAIEVA; CHEN; COUCEYRO; HOSHI, 2001; YU; ZHOU; FU; PENG *et al.*, 2017), ou que o CART causa um aumento na fosforilação de ERK nas linhagens tumorais da hipófise de ratos (GH3 e AtT20), cujo efeito foi revertido com tratamento de



inibidor da MAPKK e toxina Pertussis (LAKATOS; PRINSTER; VICENTIC; HALL *et al.*, 2005; YERMOLAIEVA; CHEN; COUCEYRO; HOSHI, 2001). Ainda, postula-se que o CART leva a um aumento da fosforilação de CREB em neurônios imunorreativos ao CRF na região periventricular do hipotálamo (JONES; KUCHAR, 2006).

Assim, é teorizado que CART tenha multireceptores, os quais desencadeiam múltiplas reações dependendo do fragmento de CART ligado e explicam suas funções diversas no organismo; com isso, diferentes receptores e vias de sinalização precisarão ser identificados (JAWORSKI; JONES, 2006).

### **3.3 CART: gene e proteína**

O gene que comanda a síntese do CART é localizado no cromossomo 5q13-q14 em humanos, e contém 2 introns e 3 exons. Dois pro-peptídeos são gerados por splicing alternativo em ratos, um produto curto e outro longo, nomeados respectivamente como proCART 1-89 e proCART 1-102, ambos funcionais, porém distintos quanto à sua localização. Essas duas variantes são funcionais em ratos, porém apenas a forma curta também é encontrada em humanos, onde não ocorre splicing alternativo desse gene (HUNTER; KUCHAR, 2003; MURPHY, 2005).

Trata-se de um gene conservado evolutivamente em mamíferos, com uma sequência nucleotídica correspondente a 91% de similaridade entre ratos e humanos. Quanto à sequência aminoacídica, a homologia é de 95%, diferindo apenas no aminoácido na posição 42, situado em uma porção relevante para sua atividade, onde há a troca do aminoácido isoleucina no peptídeo de rato, por uma valina na correspondente em humano (DOUGLASS; DAOUD, 1996). Além disso, já foram identificados sítios de ligação para diversos fatores de transcrição na região promotora do gene CART, a qual também é conservada entre humanos, ratos e camundongos. Esses indicativos apontam a complexidade e preservação do mecanismo regulatório da expressão do gene que, em conjunto com a conservação da sequência nucleotídica entre as espécies, sugerem uma importância evolutiva de sua função e regulação como molécula (DOMINGUEZ, 2006).

A sequência aminoacídica desse pro-peptídeo contém uma sequência líder que facilita sua entrada em vesículas, onde futuramente sofrerá um processamento pós-traducional para geração de suas formas ativas, CART 55-102 e 62-102. Estes são os fragmentos mais bem conhecidos derivados da forma longa do pro-peptídeo, ambos biologicamente ativos e com funções equivalentes (DOUGLASS; DAOUD, 1996; ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008). É importante mencionar que existem outros fragmentos funcionais que podem ser gerados desse processamento pós-traducional, devido ao número significativo de aminoácidos carregados positivamente, como a lisina e arginina, que formam pares dibásicos passíveis a ser sítios de clivagem (RHOLAM; BRAKCH; GERMAIN; THOMAS *et al.*, 1995). Além disso, evidências corroboram que a formação de diferentes fragmentos seja tecido-específica e que suas funções não são intercaláveis (DYLAGE; KOTLINSKA; RAFALSKI; PACHUTA *et al.*, 2006).

O CART é um peptídeo de variados tamanhos conforme o fragmento gerado (DYLAGE; KOTLINSKA; RAFALSKI; PACHUTA *et al.*, 2006). Colocaliza-se com diversos neurotransmissores, o que pode significar algum envolvimento entre eles em uma determinada função (ROGGE; JONES; HUBERT; LIN *et al.*, 2008). Sua estrutura terciária contém 3 pontes dissulfeto, as quais são conservadas em todas formas maduras do peptídeo funcional, e que são essenciais para sua conformação nativa e consequente função (MAIXNEROVÁ; HLAVÁČEK; BLOKESOVÁ; KOWALCZYK *et al.*, 2007).

### **3.4 CART: distribuição neuroanatômica**

#### **3.4.1 Núcleo *accumbens***

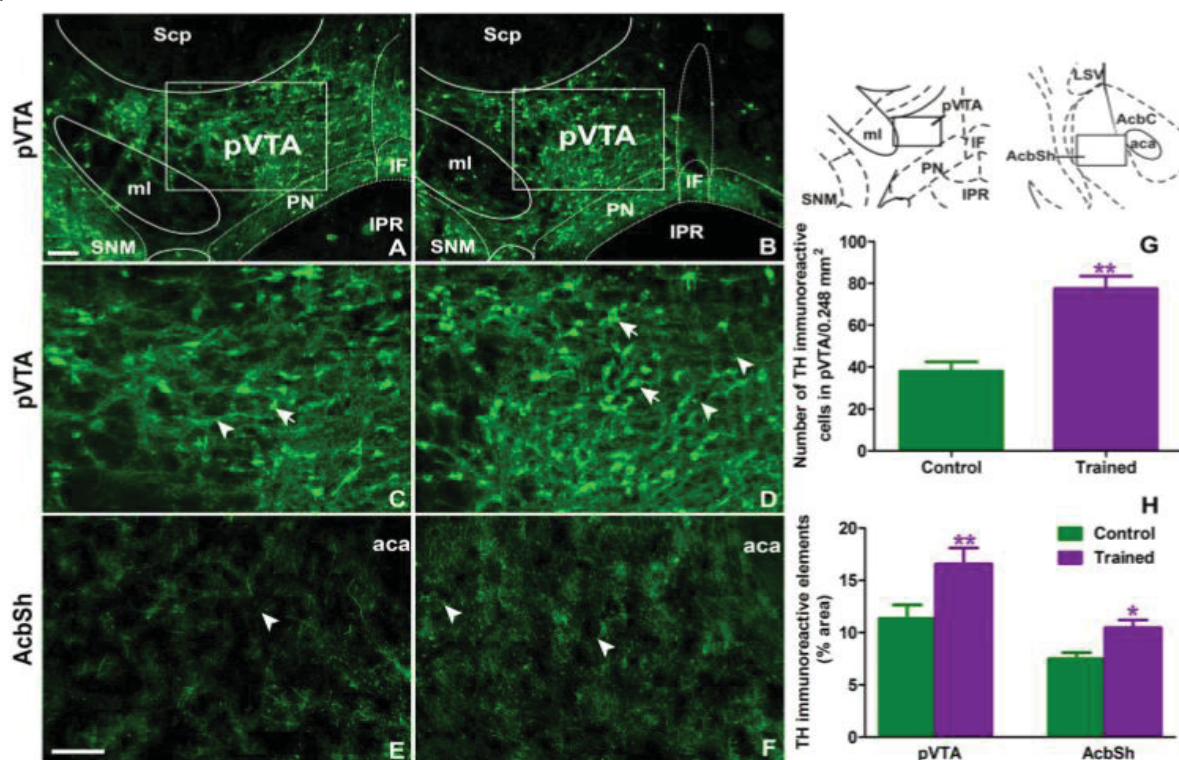
O núcleo *accumbens* (Acb) é o maior componente do estriado ventral e se divide em duas grandes regiões morfológica e funcionalmente distintas, o *core* (AcbC) e o *shell* (AcbSh) (BROG; SALYAPONGSE; DEUTCH; ZAHM, 1993; JONGEN-REËLO; GROENEWEGEN; VOORN, 1993; MEREDITH; BALDO; ANDREZJEWSKI; KELLEY, 2008; SALGADO; KAPLITT, 2015). A imunorreatividade às fibras CART é mais densa na região do AcbSh, a qual possui um papel importante na regulação da motivação, adição e recompensa,

tanto para a ingestão de alimentos ou psicoestimulantes (JAWORSKI; JONES, 2006).

Somalwar et al (2017) investigou a microinfusão voluntária de CART *in vivo* em ratos treinados a pressionar uma alavanca, resultando em uma estimulação intracraniana por um eletrodo posicionado no feixe prosencefálico medial (dentro da região lateral do hipotálamo). Constatou-se uma crescente repetição do pressionamento da alavanca, como era esperado. Depois dessa etapa, um dos grupos de animais foi submetido à inserção de uma cânula na parte posterior da área tegmental ventral (pVTA), que possibilitava a autoadministração de 100 nl de solução com CART após acionamento da alavanca. Nesses houve um aumento na frequência de pressionamentos da alavanca e reforço da ação, além de um aumento da imunorreatividade à tirosina hidroxilase (um marcador para a dopamina) na pVTA e na sua eferência, o AcbSh.

Também foi demonstrado que a co-administração do peptídeo CART com dopamina ou cocaína no núcleo accumbens provoca uma diminuição da atividade locomotora em ratos, diferentemente de quando administrado isoladamente (JAWORSKI; KOZEL; PHILPOT; KUHAR, 2003). Além disso, a administração de cocaína no Acb causou um aumento na quantidade de neurônios CART co-marcados para a proteína “fos”, um marcador de atividade neural. Outro dado interessante é o perfil de expressão de CART em pacientes dependentes de cocaína: uma concentração maior de RNAm no Acb (ALBERTSON; PRUETZ; SCHMIDT; KUHN *et al.*, 2004), o mesmo válido para vítimas de overdose pela cocaína (TANG; FASULO; MASH; HEMBY, 2003).

FIGURA 2. CONDICIONAMENTO E REFORÇO DA AÇÃO APÓS AUTO-ADMINISTRAÇÃO E MICROINFUSÃO DE CART EM RELAÇÃO AO CONTROLE.



Quantificação e representação em corte coronal em encéfalo de rato das fibras e células ir-TH (fluorescentes em verde) na área tegmental ventral posterior (pVTA) – mostrado em A,B,C e D, e na sua eferência, em uma região do núcleo accumbens (AcbSh) em E e F, entre populações de ratos treinados e ratos controle. **FONTE:** SOMALWAR; SHELKAR; SUBHEDAR; KOKARE, 2017.

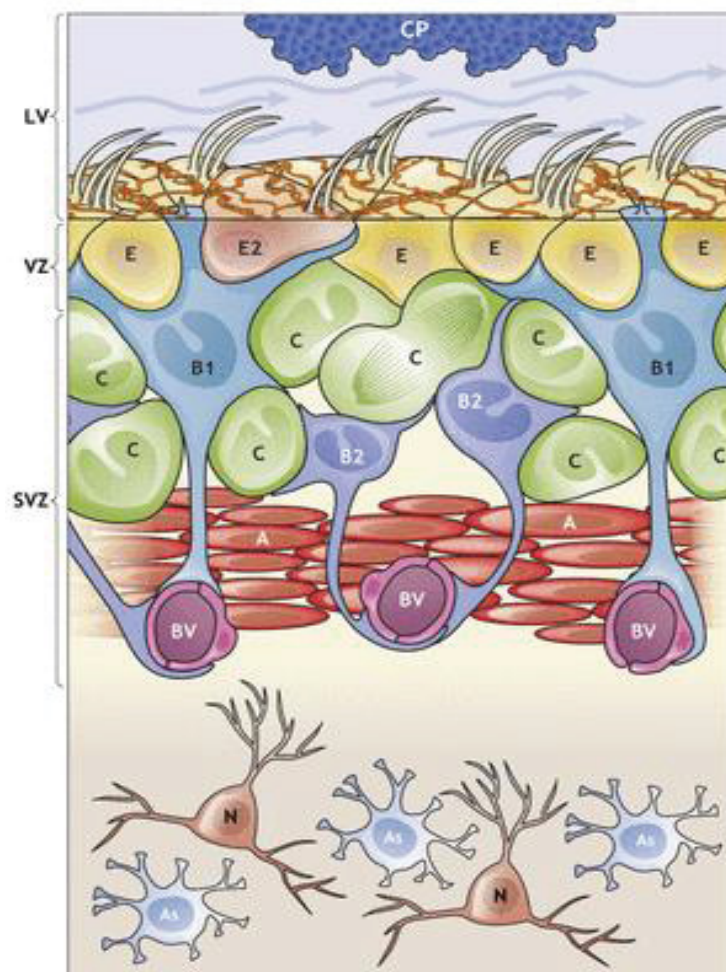
### 3.4.2 Zona ventricular-subventricular

Outra região de interesse, a V-SVZ, encontrada ao redor da parte anterior do ventrículo lateral, é uma camada de células subjacentes à camada de células endoteliais, as quais podem ser classificadas em Células E1 (multiciliadas) e E2 (biciliadas) (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997). A V-SVZ trata-se de uma zona germinativa formada por diferentes subpopulações de precursores neuronais, que mantêm suas características desde o período embrionário (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997).

Dentre essas, é importante ressaltar as células B1 - os precursores neuronais primários, de morfologia típica, mas com semelhança a astrócitos -, os quais em sua superfície basal possuem longas projeções que se comunicam com a vascularização local, e na sua superfície apical, possuem cílios primários que contatam o interior dos ventrículos laterais (DOETSCH; CAILLÉ; LIM;

GARCÍA-VERDUGO *et al.*, 1999). Além dessas, há as células tipo C - progenitores transientes de rápida divisão -, de morfologia esférica, oriundas das células B1 e geradoras das células do tipo A – neuroblastos - que migram para o bulbo olfatório, onde se diferenciam em diferentes subtipos de interneurônios (DOETSCH; CAILLÉ; LIM; GARCÍA-VERDUGO *et al.*, 1999; DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1997).

FIGURA 3. ESQUEMATIZAÇÃO E REPRESENTAÇÃO DA V-SVZ E SUAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE CÉLULAS.



Apresentação da organização das diferentes populações de células dentro da V-SVZ. Nicho neurogênico onde células B1 contatam as células endoteliais E1 E2 em sua porção apical, e em sua face basal em comunicação com os vasos sanguíneos (BV). Células de replicação rápida e transiente (C), circundam as células B1, que em conjunto com as células endoteliais formam uma estrutura análoga a um “cata-vento” sob uma visão panorâmica. Cadeia de neuroblastos imaturos (A), os quais amadurem para sua forma ‘adulta’ (N) durante a migração ao bulbo olfatório. Legenda- As: Astrócito, SVZ: Zona subventricular, VZ: Zona ventricular, LV: ventrículo lateral, CP: plexo coroado. **Fonte:** (OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2019)



Esse reservatório de células progenitoras despertou o entusiasmo de pesquisadores pela atividade neurogênica da V-SVZ mesmo na fase adulta. Ainda há controvérsias sobre a real efetividade da neurogênese em humanos (SORRELS et al. 2018, SORRELS et al. 2019), que sugere-se acontecer até o sétimo mês de vida, entretanto, é existente em outros mamíferos, como demonstrada no cérebro de roedores a migração dessas subpopulações para o estriado de ratos após lesão com ácido quinolínico (TATTERSFIELD et al, 2004).

Foi observado no bulbo olfatório pelo menos 6 subtipos diferentes de interneurônios, os quais apresentavam diferenças quanto a sua morfologia, topografia dentro da camada granular e subgranular e quanto a marcadores moleculares (Calbindina, Calretinina, TH). Essa observação conflitou a ideia na época de que a populações de neuroblastos migrando pela RMS era homogênea. Posteriormente foi visto que essa heterogeneidade antecede a migração pela RMS, e que existia uma frequência de subtipos de interneurônios diferenciados dependendo da região de origem (domínio) do neuroblasto na V-SVZ (ALVAREZ-BUYLLA; KOHWI; NGUYEN; MERKLE, 2008; MERKLE; FUENTEALBA; SANDERS; MAGNO *et al.*, 2014).

Interessantemente, fibras ir-CART são descritas na proximidade da V-SVZ (HAEMMERLE; CAMPOS; BITTENCOURT, 2015), o que conduziu à pergunta se essa inervação teria alguma participação (direta ou indireta) em alguma etapa dentro do evento da neurogênese.

Recentemente foi apontado inclusive um possível papel neuroregenerativo de CART, injetado em um tratamento intranasal após um modelo induzido de acidente vascular encefálico. Neste experimentou observou-se um decréscimo da área lesionada, reinervação no córtex lesionado, melhora funcional nos ratos pós tratamento, além de um estímulo à angiogênese. Esses dados pós tratamento são corroborados por uma maior proliferação endógena de precursores neurais e migração na SVZ, confirmado por uma maior marcação de BrdU (marcador proliferativo da fase S da mitose), Musachi-1 (marcador de célula progenitora) e PCNA (marcador de replicação gênica), e maior expressão de GAP43 (marcador de crescimento axonal), N-acetilaspártato (marcador de integridade neuronal) e BDNF (marcador de diferenciação e autorenovação) e formação de vasos sanguíneos demonstrado



por uma maior expressão de Alfa-sma (marcador endotelial). Além disso em cultura celular da V-SVZ foi observado uma formação aumentada de neuroesferas, na qual a migração promovida por CART foi antagonizada utilizando anticorpo contra BDNF (LUO; SHEN; LIU; YU *et al.*, 2013).

### **3.5 CART: epidemiologia e justificativa**

Inserido nesse cenário, uma investigação mais profunda sobre a distribuição de axônios liberadores do peptídeo e caracterização do receptor poderia elucidar sua função na via mesolímbica - onde uma desregulação pode incitar a administração contínua de droga -, ou compulsão alimentar/busca da recompensa, que é motivada pelo prazer após o uso e impelida à sua repetição, que leva à dependência e obesidade (ROGGE; GREENWALD; GOLDEN, 2004).

Segundo o relatório da UNODC (United Nations Office on Drugs and crime) para 2011, o uso de anfetaminas dentro do Brasil foi registrado como um dos maiores da América do Sul, estando atrás apenas da maconha. O NIDA (National Institute of Drug Abuse) mostrou uma tendência crescente do uso de drogas psicoestimulantes e prevalência de uso no grupo de pessoas com mais de 26 anos.

Uma explicação para esse aumento consiste no uso indiscriminado de anfetaminas para emagrecimento, ou como estimulante físico e mental, os quais a longo prazo podem causar dependência e tolerância, além de uma série de problemas tanto de saúde física e emocional e de interações sociais. Uma interpretação para esses quadros é que sejam decorrentes de uma percepção errônea dos próprios usuários, sobre o grau de morbidade dessas drogas, comparado a outras. Tudo isso, sem mencionar o uso recreativo de diversas drogas sintéticas da classe das anfetaminas, cujo constante abuso pode levar a danos cerebrais (SILVA; MARTINS; BAPTISTA; GONÇALVES *et al.*, 2010).

Por fim, a dependência por cocaína dentro do EUA, por exemplo, é um problema de saúde pública (KAMPMAN, 2009) e cerca de 1.7 milhões de pessoas entre 18 a 25 anos relataram ter usado a droga no ano de 2014 (NSDUH, National Survey on Drug Use and Health). De acordo com Reboussin

et al. (2006), há uma estimativa que 1 entre cada 6 usuários de cocaína desenvolvem alguma síndrome de dependência.

No Brasil o cenário é pior: um questionário apresentado a alunos de universidades de diferentes capitais brasileiras mostrou um aumento de 1.7% para 1.9% no consumo de cocaína entre os anos de 2004 a 2010 (CEBRID, 2010), cuja prevalência de consumo anual dentro do país equivale ao consumo de todos os outros países da América do Sul e do Norte combinados, com uma porcentagem de 2.2%, representando em torno de 3.2 milhões de pessoas (UNODC, 2012). Esse quadro, que apresenta uma grande população jovem com idade entre 15 a 34 anos, é influenciado pelo fato de o Brasil ser vizinho do Peru, Colômbia e Bolívia, que são um dos maiores produtores da droga, contribuindo negativamente para facilidade do tráfico e aumento do consumo (UNODC, 2012).

O tratamento de um dependente, tanto de anfetamina como cocaína, consiste em meios que amenizem os sintomas causados pela abstinência. Um desses meios é a prescrição de beta-bloqueadores para aliviar a ansiedade e desconforto nesse período; outro meio é evitar o relapso e uso da droga novamente, para os quais são comumente escolhidas drogas GABAérgicas, como Baclofeno, que diminuem a ativação do via dopaminérgica de recompensa (KAMPMAN, 2009).

Além desse contexto, uma alteração comportamental fruto de uma resposta neuroadaptativa também pode acontecer após o consumo exagerado e frequente de alimentos palatáveis, que tende ao quadro de obesidade (KENNY, 2011; MARGULES; OLDS, 1962), onde mostrou-se que a estimulação elétrica da via mesolímbica levou a uma compulsão alimentar em roedores. A Obesidade no Brasil é um problema de saúde preocupante: segundo a OMS, em 2025 há uma projeção de que 700 milhões de pessoas obesas, e 2,3 bilhões com sobrepeso. Nos EUA, a prevalência da obesidade é de 39.8 % para adultos e 18.5 % para jovens (NCHS, 2017). Esses números apontam a preocupação de saúde pública em torno da obesidade, que já é um problema antigo, mas que segue em crescimento mesmo sendo a causa de inúmeras doenças cardíacas, hipertensão, diabetes do tipo 2, entre outros.

Neste cenário, buscamos investigar as bases morfológicas da interação entre substâncias psicotrópicas de sinalização relacionada com o peptídeo CART com mecanismos de adaptação e formação neural. Compreender o papel do CART nesse sistema de formação neuronal pode ser uma estratégia de saúde pública útil para a recuperação de dependentes químicos e o tratamento de comorbidades relacionadas.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (número 128, página 93, livro 02), de acordo com as recomendações do CONCEA. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos da linhagem Long-Evans, com massa corporal entre 250 a 300 g, mantidos em caixas plásticas, em grupos com no máximo cinco animais, tratados com água e ração comercial ad libitum. A temperatura da sala foi controlada e mantida em  $21 \pm 1$  °C, sob um ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 07:00).

### **4.2 Preparações e processamento dos tecidos**

Os animais foram anestesiados mediante aplicação intraperitoneal de solução de hidrato de cloral a 35%, na dose de 1mL/animal. Sendo observado seu efeito, iniciou-se o procedimento para posicionamento de cânula, via transcardíaca/aorta ascendente, para uma lavagem inicial do leito vascular com solução salina 0,9%, e em seguida, perfundí-lo com cerca de 750 mL de solução de formaldeído 4% (preparado previamente a partir de paraformaldeído diluído em salina tamponada em fosfato 0,1M, aquecida a 60-65 °C) e pH 7,4.

Ao final da perfusão, os encéfalos foram removidos do crânio e imersos na mesma solução fixadora, por um período de 16 h, a 4 °C, e sequencialmente em solução crioprotetora composta de sacarose a 20% em PBS 0,1 M pH 7,4. Passado esse período, os encéfalos foram seccionados em micrótomo de congelamento, em espessura de 40  $\mu$ m, coletados em solução de PBS 0,1 M, pH 7,4, 0,1% azida de sódio e etilenoglicol, e armazenados a – 20 °C.

O mesmo material foi então transportado até o laboratório de investigação neuroquímica e ultraestrutural do Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Paraná, para armazenamento e processamento futuro das reações imunoistoquímicas.

#### **4.3 Imunoistoquímica para o CART: o método da peroxidase combinado com o método de intensificação pela Ag**

O procedimento consistiu inicialmente em lavagens das secções em PBS 0,1 M, pH 7,4 e tratamento com solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS. Após novas lavagens em PBS, as secções foram incubadas em solução contendo 0,3% de Triton X-100, 3% de soro normal de cabra (Vector Laboratories – USA), anticorpo primário anti-CART, policlonal, gerado em coelho [1:5000] em PBS 0,1 M, pH 7,4, por 18 h, em temperatura ambiente e sob constante agitação.

Passado esse período, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M, pH 7,4, e posteriormente incubados em anticorpo secundário para a Ig-G de coelho, biotinilado, gerado em cabra (Vector Laboratories - USA), [1:800], por 1 h, sob constante agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, e após novas lavagens em PBS, as secções foram incubadas no complexo avidina-biotina, [1:333] (Kit Elite, Vector Laboratories – USA), por 1 h, sob constante agitação, em temperatura ambiente. Após, os cortes foram novamente lavados em PBS, e em seguida, lavados com tampão Triz-HCl 0,1 M, pH 7,4, para então iniciar-se a reação de peroxidase, fornecida por 6 mg do cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma), 20 ml de Triz-HCl 0,1 M, pH 7,4 e 3 µl de peróxido de hidrogênio, durante cerca de 7 min.

A reação foi finalizada com lavagens em Triz-HCl 0,1 M, pH 7,4 e em seguida por lavagens em PBS 0,1 M, pH 7,4. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas em série crescente de álcoois para em seguida permanecerem imersas em xilol durante 7 dias, para posterior realização do procedimento de intensificação da reação de peroxidase pelo método da Ag.

O método de intensificação pela Ag consistiu na reidratação das amostras montadas em lâminas sob concentrações crescentes de álcoois. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de nitrato de prata a 1% (em água destilada e hidróxido de amônio), a 56 °C por 75 min. Após isso, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 min, e então, incubadas em solução de tiosulfato de sódio a 5%, por 5 min, em temperatura ambiente. A

finalização do procedimento consistiu em nova lavagem do material em água corrente, desidratação, deslipidificação e cobertura com lamínulas, utilizando como meio dióptrico o DPX (Aldrich – USA).

#### **4.4 Imunofluorescência**

O procedimento consistiu inicialmente em lavagens das secções em PBS 0,1 M, pH 7,4, seguida de incubação em solução contendo 0,3% de Triton X-100, 3% de soro normal de cabra e/ou burro (Vector Laboratories – USA), anticorpos primário anti-CART, gerado em coelho [1:1000] e anti DARPP-32, gerado em camundongo, [1:500], ou novamente o anticorpo primário anti-CART [1:1000] e anti-vimentina, gerado em camundongo, [1:1000] em PBS 0,1 M, pH 7,4, por 18 h, em temperatura ambiente, sob constante agitação e protegido da luz.

Passado esse período, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M, pH 7,4, e posteriormente incubados em anticorpo secundário anti-mouse conjugado ao Cy3, gerado em cabra, e anti-rabbit conjugado ao FITC, gerado em burro (Vector Laboratories - USA), [1:1000], por 2 h, sob constante agitação, em temperatura ambiente e proteção da luz. Após esse período, foram realizadas 3 lavagens em PBS 0,1 M, pH 7,4 com duração de 10 min cada uma. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínula utilizando como meio dióptrico o tampão glicerol.

#### **4.5 Método de coloração de Giemsa**

Para o estudo da citoarquitetura da região da V-SVZ, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois (50%, 70%, 2x 95%, 3x 100%), durante 3 min, exceto a última que permaneceu por 30 min. Após essa etapa as amostras foram diafanizadas em xilol, na primeira vez por 3 min, e na segunda 30 min. Realizado isso, foi feita a reidratação em concentrações decrescentes de álcool (3x 100%, 2x 95%, 70% e 50%) com duração de 3 min para cada uma, com hidratação conseguinte em água destilada por 3 min.

Em seguida, as amostras foram imersas em tampão fosfato monobásico 0,1 M por 2 min, para então serem incubadas em corante Giemsa por 15 min, a 60°C. Assim feito, as lâminas foram rapidamente lavadas em água destilada, e



então desidratadas em concentrações crescentes de álcool 70%, 95% e 2x em álcool 100%, em cerca de 10 a 15 s cada etapa, exceto a última, com 2 min. Finalmente as lâminas foram deslipidificadas em xilol e cobertas usando meio de montagem permanente DPX (Sigma-Aldrich, USA).

#### **4.6 Aquisição, processamento e análise das imagens**

As imagens obtidas pelo método de peroxidase foram capturadas em microscópio de luz de campo claro Olympus BX51 do centro de tecnologias avançadas em fluorescência do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. As fotos para quantificação foram capturadas na objetiva de 20x, com brilho e contraste ajustados manualmente, procurando manter uma constância e atenção nos ajustes entre elas. O software usado para quantificação da densidade das fibras nervosas foi o ImageJ Fiji, que é gratuito e acessível, e substitui a contagem manual. Para quantificação foi utilizado a metodologia proposta por Grider et al (2006) que utiliza o plugin FeatureJ (baixado e adicionado), o qual utiliza o algoritmo Hessiano, que tem a vantagem de realçar e detectar estruturas lineares como axônios, sendo um filtro já difundido na imagiologia médica com propostas similares (SATO; NAKAJIMA; SHIRAGA; ATSUMI *et al.*, 1998).

Quanto as fotomicrografias obtidas para fluorescência, as mesmas foram capturadas pelo microscópio Confocal A1R MP com o auxílio de um técnico, e assim processadas para o nosso fim no software ImageJ Fiji, realizando o merge das fluorescências, projeção máxima e projeção ortogonal quando necessário.

##### **4.6.1 Quantificação semi-automática**

Para quantificar a inervação nos quatro diferentes domínios da V-SVZ: ventral, medial, lateral e dorsolateral, representados na fig. 4, delimitamos áreas entre 45.000 a 50.000  $\mu\text{m}^2$  para cada domínio. Nestes, foi quantificada a densidade de fibras nervosas marcadas com valor dado em unidades de pixels. Essa avaliação é importante, pois oferece uma representação numérica de quantos axônios ir-CART há em cada domínio, e se existem diferença entre os domínios. Outra comparação realizada foi quanto a densidade de fibras

exibidas ântero-posteriormente dentro do mesmo domínio nos cortes coronais, abrangendo o ponto craniométrico Bregma entre 1.70 mm ao -0.92 mm.

Assim, as fotos obtidas foram analisadas no programa ImageJ Fiji e inicialmente convertidas para uma imagem binária 8-bits. Delimitamos a área de interesse e aplicamos o filtro Hessiano do plugin FeatureJ. Dentre as opções nesse filtro, habilitamos apenas a caixa “smallest eigen values” e consideramos o valor de 0.55 para valor absoluto, diferente de 1.0 que Grider e cols (2006) apresentaram em seu trabalho, pois em nossas imagens este foi o valor que melhor sublinhava visualmente as fibras nervosas, destacando-as do fundo, sem prejuízo à imagem.

Após essa etapa era necessário que a imagem fosse convertida para 8-bits novamente, pois após a aplicação do filtro o valor retornava automaticamente para 32 bits. Em seguida foi alterado o brilho/contraste, ajustando os valores mínimo e máximo até alcançar-se manualmente a faixa onde aparecessem os axônios isolados em um fundo branco, com cautela para minimizar o background e presença de artefatos.

Para finalizar a quantificação, aplicou-se o *threshold* na imagem e a conversão das fibras destacadas dentro da área delimitada. Por fim, selecionou-se a opção análise de partículas, habilitando as opções *summarize*, *exclude on edges* e *include holes*, além de manter a contagem em unidades de pixels. Assim, era mantido um padrão na quantificação em todas as figuras.

#### 4.7 Análise estatística

Os dados da quantificação semi-automática foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 8.4.2, utilizando a análise de variância (ANOVA). A comparação entre os quatros diferentes domínios foi realizada para os Bregmas -0.6, 0.2, 0.48 e 0.7 dentro da faixa de -0.92 a 1.7, em virtude da maior representatividade amostral dentro desses pontos. Os dados obtidos foram gerados pelo teste de Tukey por múltiplas comparações, sendo definido para significância que \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ou \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Quantificação da inervação de fibras CART imunorreativas

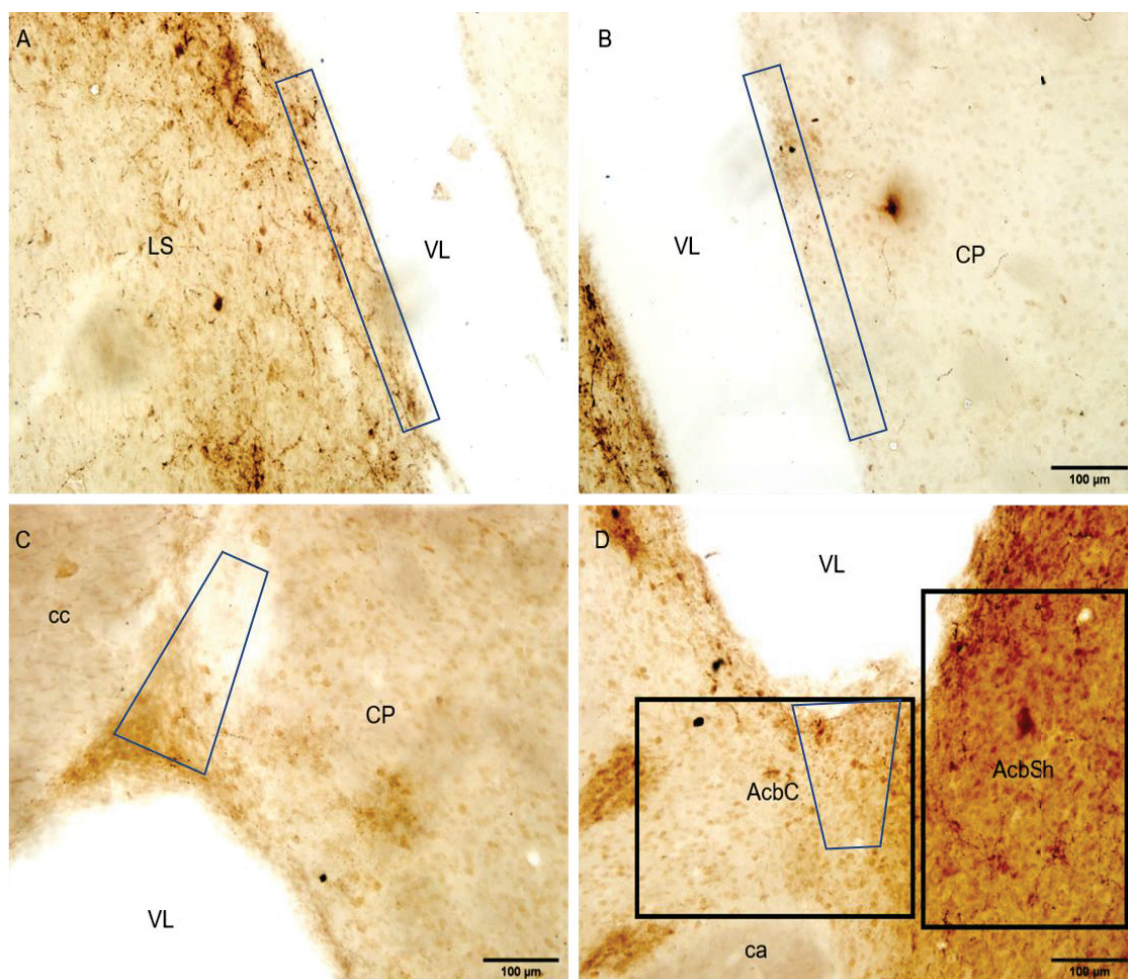
A impregnação por prata seguinte à reação pela peroxidase/DAB foi uma etapa essencial para a conseguinte metodologia semi-quantitativa, pois enaltece as características dos axônios marcados pelo cromógeno, os quais antes dessa etapa apresentavam simplesmente uma coloração acastanhada (fig. 4).

As amostras foram microfotografadas sob condições constantes de exposição à luz do microscópio e então quantificadas por metodologia adaptada de Grider et al e uso do plug-in FeatureJ do Software Fiji, que julgamos ter sido eficaz, além de ser gratuita, comparada a custosas opções automatizadas alternativas. Um exemplo do sequenciamento dos passos que permitiram a quantificação pelo plug-in é apresentada na fig. 5, que demonstra desde a aquisição da figura original, processamento pelo plugin, delimitação da área desejada, alterações de brilho e contraste e por fim a quantificação.

Foi possível observar o maior contraste dessas fibras após aplicação do filtro, o qual destacava os nuances e a informação da imagem. Esse aprimoramento era ainda mais notório quando a imagem original tinha uma marcação fraca, dando visibilidade à inervação.

Foi tomado cuidado para que o valor eigênico escolhido não surtisse nenhum efeito negativo na imagem e acentuasse artefatos ou o *background*, e não tivesse nenhum reflexo na quantificação.

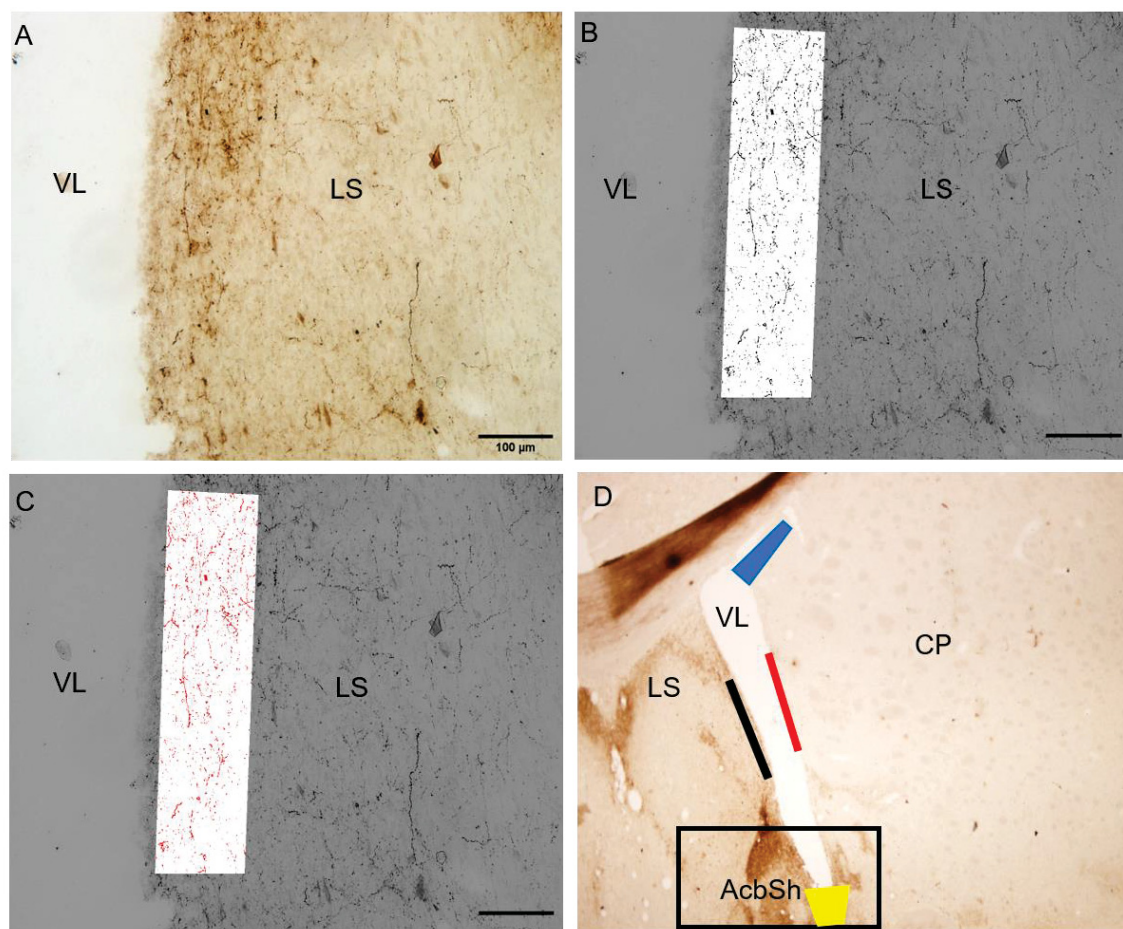
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO VISUAL DA INERVAÇÃO IR-CART NOS QUATRO DOMÍNIOS DA V-SVZ.



Representação dos quatro diferentes domínios selecionados para quantificação da inervação de fibras ir-CART (A-D), delimitados por um retângulo ou losango em azul. Fotomicrografias obtidas na objetiva de 20x pelo microscópio Olympus BX51 após a reação de imunistoquímica pelo método de Peroxidase/DAB seguido da intensificação por prata. Em A, temos o domínio medial, majoritariamente adjacente ao território do núcleo septal lateral. Em B, temos o domínio lateral, justamedialmente ao território do Caudado putâme (CP). Em C, domínio dorsolateral, contíguo com a parede do ventrículo lateral subjacente ao corpo caloso, fazendo vizinhança com o Caudado Putâme. Finalmente em D, o domínio ventral, ocupado pelos subterritórios do Acb. Legenda: AcbC: região core do núcleo accumbens, AcbSh: região shell do núcleo accumbens ca: comissura anterior, cc: corpo caloso, CP: Caudado Putâme, LS: núcleo septal lateral, VL: Ventrículo lateral. Barra de escala: 100um.



FIGURA 5. SEQUÊNCIA DE PASSOS DA METODOLOGIA SEMI-AUTOMÁTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DENSITOMÉTRICA DAS FIBRAS IR-CART PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA PELO MÉTODO PEROXIDASE-DAB.



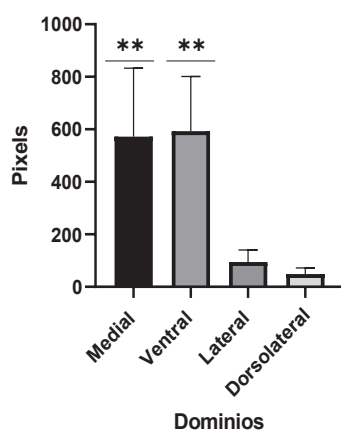
Fotomicrografia original (A) obtida em campo claro pelo microscópio Olympus BX51 em objetiva de 20x. Em B conversão para uma imagem binária, seguido da aplicação do filtro Hessiano pelo FeatureJ e ajustes no contraste/brilho para isolamento de fibras dentro da área delimitada de interesse (45.000 – 50.000  $\mu\text{m}^2$ ). Em C aplicação do *Threshold* para destaque das fibras imunorreativas (vermelho) para posterior quantificação em pixels da densidade axonal. Em D representação ilustrativa dos domínios almejados: domínio medial (preto), lateral (vermelho), ventral (amarelo) e dorsolateral (azul), obtidas em objetiva de 4x. Legenda - AcbSh: Porção Shell do núcleo accumbens, CP: Caudado Putame, LS: Núcleo Septal Lateral, VL: Ventriculo lateral. Barra de escala - A,B,C: 100 $\mu\text{m}$ .

Também obtivemos uma representação da comparação dos quatro diferentes domínios que englobam a V-SVZ, em quatro diferentes Bregmas onde foram obtidos uma maior representação numérica de cortes (gráfico 1). Observamos uma diferença estatisticamente significativa para os domínios medial e ventral - os quais foram catalogados de acordo com o *p-value* obtidos - em comparação com o domínio dorsolateral, e que foram os mais representativos para evitar a poluição visual do gráfico. A média dos domínios de maior inervação para os domínios medial e ventral foram em cerca de 5 a

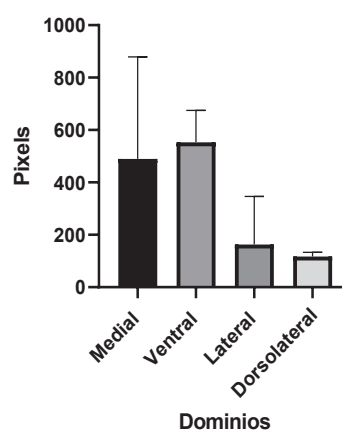
10 vezes maiores em relação ao lateral e dorsolateral, e essa predominância foi observada em todo eixo rostrocaudal entre os diferentes cortes, sublinhando a alta inervação nessas porções.

GRÁFICO 1. QUANTIFICAÇÃO DENSITOMÉTRICA DA INERVAÇÃO DE FIBRAS IR-CART PARA OS QUATRO DOMÍNIOS DA SVZ.

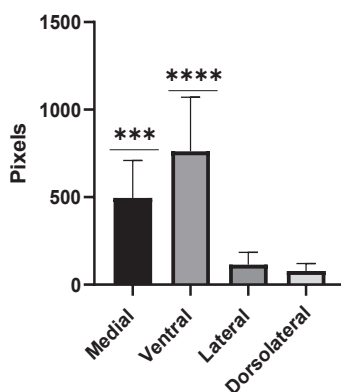
Quantificação densitométrica (Bregma 0.48)



Quantificação densitométrica (Bregma 0.2)



Quantificação densitométrica (Bregma -0.6)



Quantificação densitométrica (Bregma 0.7)

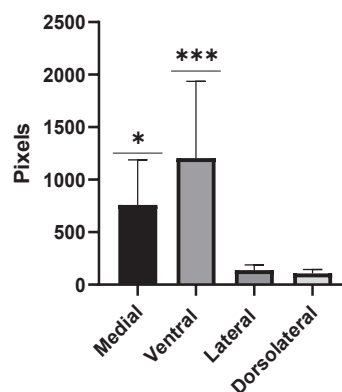


Gráfico em barras das médias densitométricas (em pixels) das fibras imunorreativas ao CART dentro dos quatro diferentes domínios da SVZ. Valores mensurados para uma área delimitada de 50  $\mu\text{m}^2$  para cada domínio nos respectivos Bregmas: -0.6, 0.2, 0.48 e 0.7. Sendo definido \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ou \*\*\*\*  $p < 0.0001$  para os valores de significância.

## **5.2 Ensaio de Imunofluorescência de dupla marcação para CART e DARPP32**

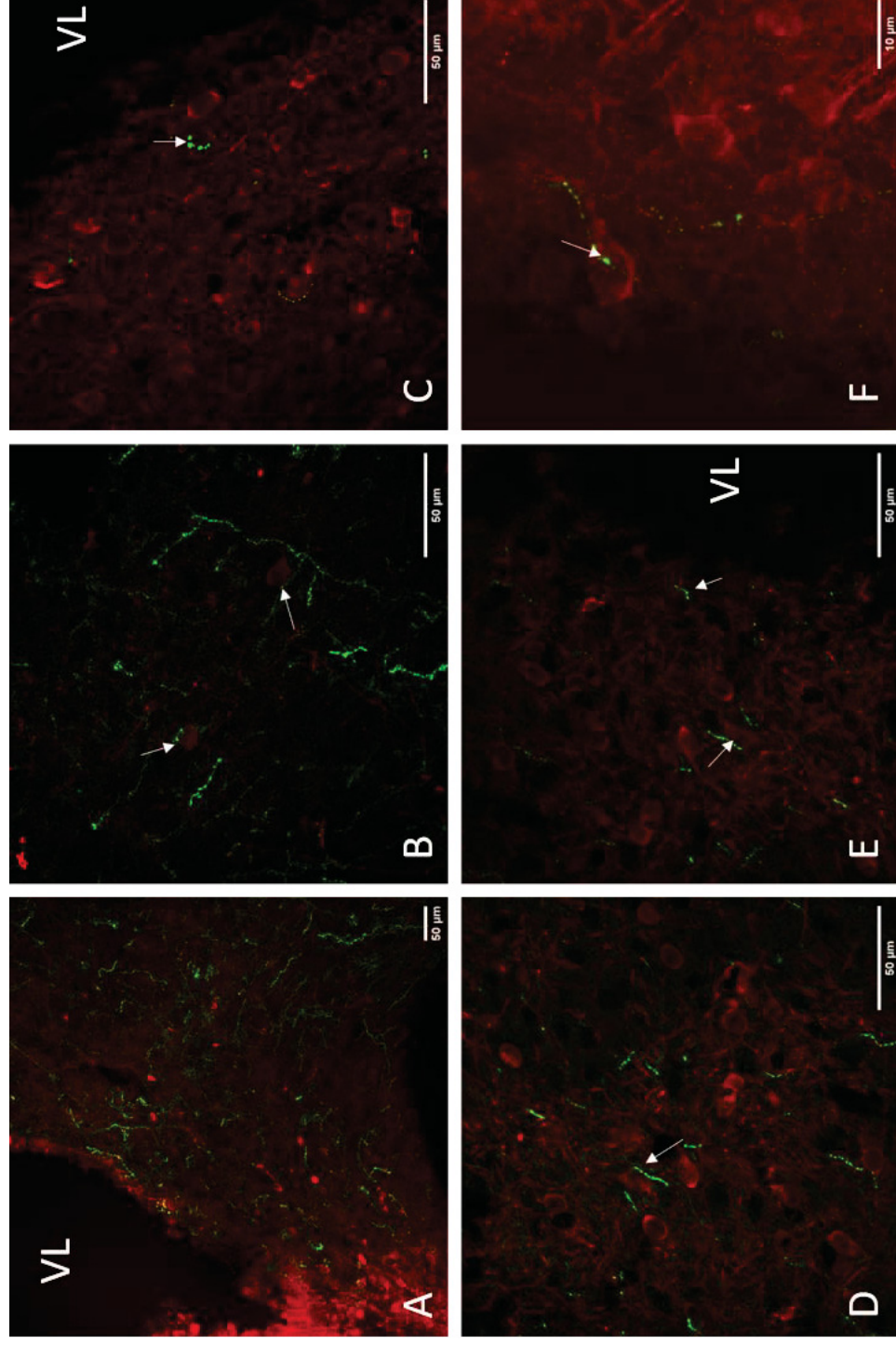
Nos ensaios a seguir, observados em microscopia confocal, trazemos uma descrição semi-qualitativa sobre o trajeto e aposições encontradas em nossas amostras.

Foi observado que a imunorreatividade ao DARPP32 marcava todo o neurópilo do neoestriado, com destaque para a região do núcleo accumbens, onde era visível uma maior intensidade do fluoróforo, condizente com a literatura devido a alta ação dopaminérgica na região. Em especial quando visualizados no microscópio confocal, era mais nítida a distinção e delineamento dos corpos celulares, para então identificar-se a presença de fibras ir-CART formando aposições (figs. 6 B – F).

Em alguns segmentos notamos uma característica curvilínea da fibra, que condizia com a morfologia do corpo celular fluorescente para DARPP32 (fig. 6C), onde ocorria a aposição das varicosidades dos axônios com a membrana da soma do neurônio. Essa observação foi complementada com a visualização ortogonal, que confirmava a aposição considerando as marcações em um mesmo plano do eixo Z.



FIGURA 6. Ensaio de imunofluorescência de dupla marcação para CART e DARPP32.



Fotomicrografias de seções de encéfalo de ratos Long Evans, visualizado em microscópio confocal. Em A, fotomicrografia obtida na objetiva de 20x evidenciando a densa inervação de fibras CART fluorescentes (verde) na porção medial do ventrículo lateral, como também inúmeros corpos celulares marcados pelo anticorpo anti-DARPP32 (vermelho). Nas demais fotomicrografias (B-F) destaque para as setas, apontando sítios de possível sinapses axosomáticas, onde é observado segmentos dos axônios CART-ir circundando os corpos celulares. Legenda- VL: Ventrículo lateral

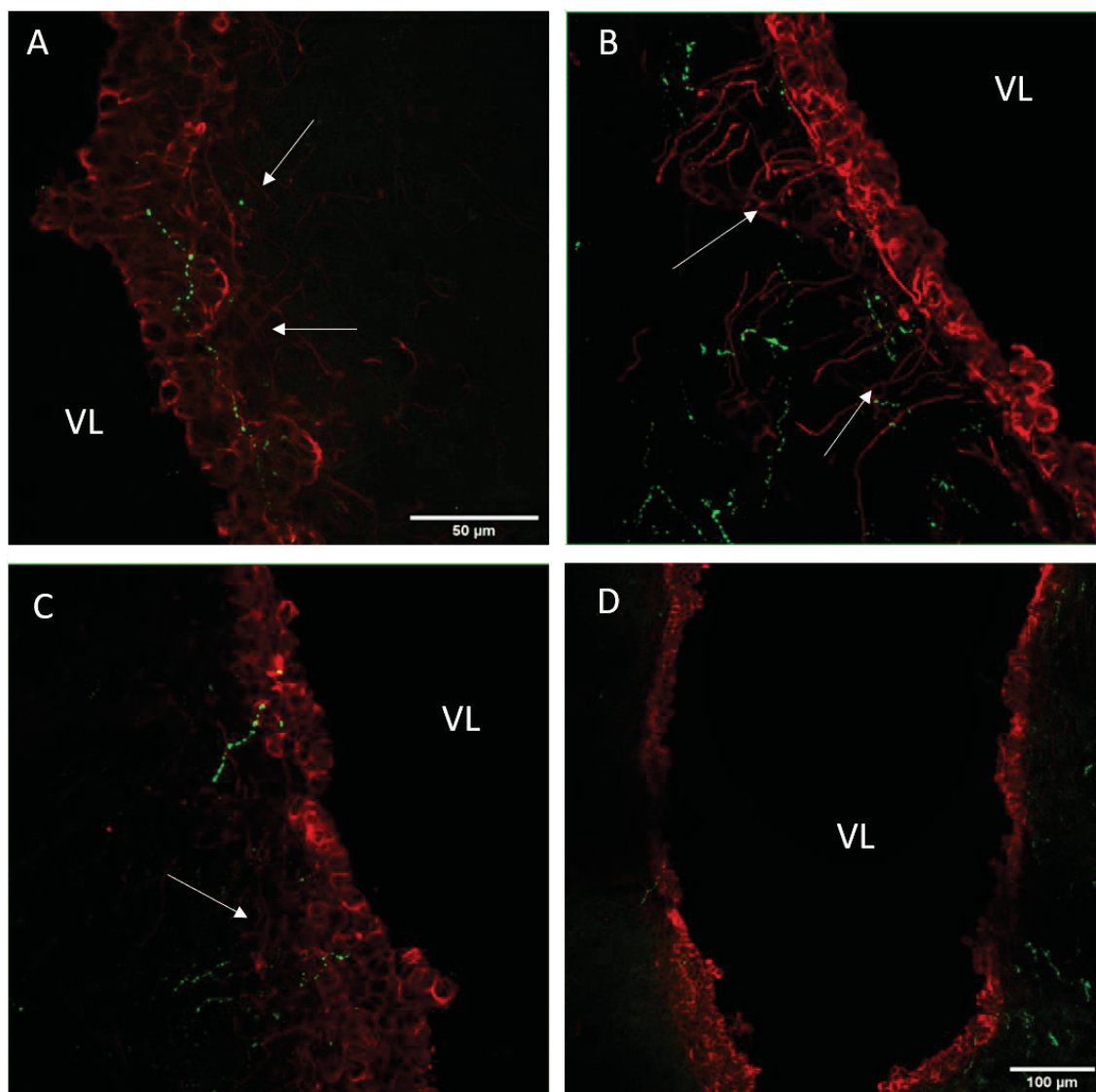
### **5.3 Ensaio de imunofluorescência de dupla marcação para CART e vimentina**

Foi observada uma nítida e característica marcação da vimentina delineando a camada ependimária, muitas vezes semelhante a uma colmeia devido a uma morfologia hexagonal reproduzida por seus corpos celulares. Em contrapartida, vimos em alguns casos - de modo particular nas partes ventrais do ventrículo lateral - a presença de extensões das células ependimárias que se projetavam para o neocórtex (figs. 7A –B, representado por setas).

Em determinadas amostras os axônios ir-CART ocuparam o espaço abaixo a essa camada de células ependimárias, formando aposições com as projeções supracitadas (fig. 7B), como também adentrando a mesma se posicionando na superfície apical das células ependimárias (fig. 7C).

As imagens corroboram com os dados da imunohistoquímica pela peroxidase sobre a presença e consistência de fibras CART no domínio da V-SVZ, reforçando do ponto de vista anatômico uma função territorial.

FIGURA 7. Ensaio de imunofluorescência de dupla marcação para CART e Vimentina.



Fotomicrografias de secções de encéfalo de rato Long Evans, obtidas por microscopia confocal. Visualização de fibras ir-CART em verde inseridas na camada endimária (vermelho) (A,B,C,D). Em D apresentação da marcação característica das células endimárias em toda extensão do ventrículo lateral. Setas apontam protusões filamentosas subjacentes aos endimócitos. Legenda- VL: Ventrículo lateral. Barra de escala- A,B,C: 50um e D:100um

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Inervação de axônios ir-CART nos domínios da V-SVZ

O mapeamento da distribuição de axônios é um dado que tem sido destacado em investigações funcionais que apresentem aspectos morfológicos e estruturais (CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; GOTO; CIPOLLA-NETO *et al.*, 2011; PATI; MARCINKIEWCZ; DIBERTO; COGAN *et al.*, 2020; TONG; CHEN; CEBRIÁN-SILLA; MIRZADEH *et al.*, 2014). Dentre as técnicas disponíveis, inicialmente se preconizava a descrição baseada em análises semi-qualitativas que comparavam as densidades de inervação encontradas (HAEMMERLE; CAMPOS; BITTENCOURT, 2015; JONGEN-RĚLO; GROENEWEGEN; VOORN, 1993; KOYLU; COUCEYRO; LAMBERT; KUCHAR, 1998), às quais foram substituídas - quando possível - por análises quantitativas, inclusive em caráter automatizado (GRIDER; CHEN; SHINE, 2006; REYNAUD; CULL; WANG; FORTUNE *et al.*, 2012; SATHYANESAN; OGURA; LIN, 2012; ZAREI; SCHEETZ; CHRISTOPHER; MILLER *et al.*, 2016).

No entanto, análises automatizadas possuem contratempos, como o alto custo financeiro, o que inviabiliza sua disseminação na comunidade científica. E caso a quantificação seja realizada manualmente, a contagem de cada axônio isoladamente dentro do núcleo de interesse pode ter um viés em regiões de alta densidade de fibras, por formarem feixes com projeções recorrentes (GRIDER; CHEN; SHINE, 2006).

Esta característica, observada principalmente nos domínios ventral e medial da V-SVZ (MERKLE; MIRZADEH; ALVAREZ-BUYLLA, 2007) - os quais se sobrepõem aos núcleos *accumbens* e septal lateral, respectivamente - corrobora a análise semi-qualitativa de Koylu *et al.* (1998), uma vez que as fibras ir-CART se dispõem como uma malha de colaterais axonais sinuosos e recorrentes, onde é difícil discriminar as fibras unitárias, abrindo margem a uma quantificação errônea.

Com isso, nosso grupo utilizou uma metodologia inspirada por Grider (2006) que testou a eficiência do algoritmo de detecção de cantos baseado na matriz hessiana do plugin FeatureJ (disponível gratuitamente para download) do Fiji comparada com dados fornecidos por contagem manual e por softwares Photoshop e Metamorph, da quantificação de fibras serotoninérgicas fluorescentes no córtex de ratos. Após validação do método, este foi utilizado

pelo mesmo grupo posteriormente para comparar o brotamento induzido de fibras serotoninérgicas no córtex de ratos antes e após o tratamento com BDNF (GRIDER; MAMOUNAS; LE; SHINE, 2005).

Aplicamos algumas adaptações ao referido método para atingir o escopo deste estudo: a respeito do valor eigênico, mantivemos a escolha do menor valor, o qual realiza a detecção do menor grau de curvatura da imagem, que no caso corresponderia as bordas (*edges*) de estruturas lineares pequenas, e desse modo, obtivemos uma melhor resolução da estrutura e morfologia, que por conseguinte permitiu uma melhor delimitação e delineamento do axônio. Também alteramos o valor do *smoothing scale* sugerido por Sathyanesan et al (2012) de 1.0, anteriormente postulado por Grider (2006), para o valor de 0.5, pois o inicial de 1.0 não atendeu as nossas expectativas e causava um efeito negativo na imagem, acentuando o background e desse modo, a credibilidade da densitometria.

Um dos motivos para essa mudança, acreditamos ser que os artigos que utilizaram essa metodologia marcaram o antígeno alvo por imunofluorescência. Como optamos por uma técnica cuja marcação seja permanente e proporcione uma maior acuidade na identificação da fibra, que é a imunoperoxidase seguida da intensificação por prata, que tem por objetivo acentuar a marcação inicial por DAB, é provável que diante de um aumento no background no tecido, o valor inicial de 1.0 seja inadequado por enfatizar artefatos indesejados. Ainda, é possível que o valor sofra interferência por prováveis diferenças no diâmetro do axônio, decorrentes da marcação final, ou pela característica varicosa que as fibras ir-CART exibem.

A respeito de não seguirmos a mesma técnica de detecção imunoistoquímica de Grider (2006), consideramos a dificuldade de agendamento para utilização do microscópio a *laser* confocal, custo da manutenção da opção de imunofluorescência empregado em tantas repetições dentro do número de nossas amostras, além do fato de ser uma marcação sujeita ao *photobleaching*, ou seja, não duradoura a exposições contínuas à fluorescência - necessárias para o mapeamento axonal.

Quanto à quantificação propriamente dita, os domínios ventral e medial apresentaram a maior densitometria axonal, em média 5 a 10 vezes maior

comparado com os demais. Foi observado uma tendência de maior inervação em cortes posteriores, localizados no eixo ântero-posterior entre os pontos craniométricos do Bregma de  $-0.6$  e  $-0.92$ , com fibras percorrendo a região ântero-medial do núcleo intersticial da estria terminal, contínua à zona endimária, até o núcleo septal lateral. No último nível posterior considerado ( $-0.92$ ), as fibras ir-CART ainda ocupam o núcleo intersticial da estria terminal, em sua região pósteromedial, o que é condizente com as observações de Fagergren e colaboradores (2007), que descreveu a presença de RNAm de CART nesses núcleos. Uma descrição anatômica dessa inervação sugere que o CART presente em regiões de integração do sistema límbico poderia ter uma influência comportamental, na ansiedade, estresse, medo inato, e uma função complementar na recompensa, e na ingestão de alimento mediada pelo núcleo septal lateral (JANZSÓ; VALCZ; THUMA; SZOKE *et al.*, 2010).

Ainda no bregma  $-0.92$ , observamos aqui a maior inervação para o domínio medial da V-SVZ, fazendo vizinhança em especial com o núcleo septofimbrial (SFi), que curiosamente apresenta marcação para CART em outros níveis, como por exemplo, em um território próximo à linha média, na junção dos dois hemisférios. Ainda assim, apesar de um leve declínio na quantificação do domínio medial em cortes anteriores, visualizamos uma quantidade alta de fibras nervosas marcadas em um núcleo vizinho ao nosso domínio de interesse, sobretudo na região intermediária do núcleo septal lateral, conforme descrito por Koylu e colaboradores (1998).

Ainda no domínio medial, não observamos um padrão de valores ao longo do eixo ântero-posterior, em relação ao bregma. Supomos que um dos motivos seria uma marcação inespecífica nas células endimárias após a impregnação por prata, sobretudo quando havia, ainda que mínimos, artefatos de background da reação do DAB/ peroxidase. Ainda que nessa etapa o tempo de reação do DAB com o peróxido de hidrogênio fosse cronometrado para mantermos uma constância do tempo, em algumas ocasiões foi necessário que o mesmo se estendesse até atingir a marcação desejada, já que há variantes que interferem na velocidade dessa reação (Bittencourt J.C, Elias C.F. 2007). Assim, as amostras que resultaram em um maior background contavam com pequenos artefatos que, mesmo após a edição no Fiji para que fossem



isolados das fibras a serem quantificadas, acabaram superestimando determinados valores retornados pelo programa.

Em níveis anteriores ao bregma destacamos a imunorreatividade ao CART presente no núcleo accumbens (Acb), um território que corresponde à parte ventral do estriado (Brog et al. 1993). Este núcleo ocupa o domínio ventral do ventrículo lateral, recebendo uma inervação profusa de axônios ir-CART, sobretudo em sua região *shell* (AcbSh) onde a participação do CART dentro do sistema mesolímbico é melhor descrita (HUBERT; JONES; MOFFETT; ROGGE *et al.*, 2008; MEREDITH; BALDO; ANDREZJEWSKI; KELLEY, 2008; WISE, 2005). Entretanto há de se levar em conta que o Acb é relativamente extenso nos eixos ântero-posterior e médio-lateral. Sua área é dividida em três subterritórios, onde há evidências de uma multi-compartimentalização imunoistoquímica, distintas quanto sua organização, morfologia celular, função e hodologia (BROG; SALYAPONGSE; DEUTCH; ZAHM, 1993; JONGEN-RĚLO; GROENEWEGER; VOORN, 1993; ZAHM; BROG, 1992). Dentro da extensão do Acb, a porção delimitada de interesse para quantificação nesse projeto engloba em especial a “ventral tip”, uma área restrita do AcbSh (BROG; SALYAPONGSE; DEUTCH; ZAHM, 1993; MERKLE; MIRZADEH; ALVAREZ-BUYLLA, 2007) onde em níveis anteriores nosso grupo observou *clusters* de neuroblastos que se estendiam pela zona subventricular até a região subjacente ao corpo caloso (cc), corroborando Doetsch et al. (1992).

Dentro dos domínios lateral e dorsolateral, a quantificação foi significativamente menor. No domínio lateral havia algumas fibras, aparentemente mais longas, mas ocorriam de maneira mais isolada. No domínio dorsolateral a presença de fibras marcadas para CART era ainda mais raro, normalmente pequenas, e se encontravam bem próximo do corpo caloso ou adentrando-o. Estas observações seguem conformidade com a descrição da inervação da parte dorsal do estriado por Koylu e colaboradores (1998).

## 6.2 CART e DARPP32

O DARPP-32 (Dopamine and cAMP regulated phosphoprotein) é uma proteína de 32kD, exclusiva do tecido nervoso, cujo estado fosforilado é estimulado pela interação da dopamina com o receptor dopaminérgico, que por



consequente eleva a concentração intracelular de AMPc, resultando em sua fosforilação. Dessa maneira, DARPP-32 é correlacionada com uma neurotransmissão dopaminérgica, mais precisamente de receptores D1 (FIENBERG; HIROI; MERMELSTEIN; SONG *et al.*, 1998; GREENGARD; ALLEN; NAIRN, 1999).

Diante da dopamina ser um neurotransmissor envolvido na regulação da neurogênese (KIM; WANG; COMTE; PASTRANA *et al.*, 2010; LENNINGTON; POPE; GOODHEART; DROZDOWICZ *et al.*, 2011), decidimos investigar se o CART estaria em posição estrutural de exercer sua ação sobre células da V-SVZ fosforiladas pela transmissão da dopamina. Assim foi realizada uma dupla marcação de imunofluorescência para CART e DARPP-32. Observamos a marcação de DARPP-32 principalmente no neurópilo do neostriado e núcleo accumbens, como era previsto, pois são áreas ricas em receptores D1 e de intensa ação dopaminérgica (MEREDITH; BALDO; ANDREZJEWSKI; KELLEY, 2008; WISE, 2005). Foi possível distinguir uma alta densidade de corpos celulares ir-DARPP-32 nessas regiões, como também fibras ir-CART, algumas delas aparentando circundar o corpo celular e fazer aposição de suas varicosidades em alguns pontos da soma da célula dopaminérgica.

A fim de corroborar com a premissa de que poderia haver sinapse e comunicação entre eles, realizamos o estudo da projeção ortogonal, pois assim poderíamos visualizar esses pontos de interesse de maneira mais isolada. Foi observado em alguns segmentos a presença de terminais imunorreativos das fibras em contato com o corpo celular, seja com a fibra nervosa tocando lateralmente, mas também subjacente e/ou suprajacente ao corpo celular. Esses dados sugerem a ocorrência de sinapses axosomáticas e uma condição de posição estrutural para comunicação/influência de CART sob as populações de células desses territórios.

Evidências mostram um papel neurogênico relevante da ação dopaminérgica na V-SVZ oriunda da inervação de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (LENNINGTON; POPE; GOODHEART; DROZDOWICZ *et al.*, 2011), na qual foi feito uma análise ultraestrutural comprovando o contato de fibras aferentes dopaminérgicas em contato com as células C de rápida transição da SVZ, as quais expressam seu receptor (HÖGLINGER; RIZK; MURIEL; DUYCKAERTS *et al.*, 2004).

Foi sugerido a participação de receptores D2 em camundongos (HÖGLINGER; RIZK; MURIEL; DUYCKAERTS *et al.*, 2004) e D3 em ratos (DIAZ; RIDRAY; MIGNON; GRIFFON *et al.*, 1997; KIM; WANG; COMTE; PASTRANA *et al.*, 2010; VAN KAMPEN; HAGG; ROBERTSON, 2004) como agentes moduladores positivos na proliferação de precursores dentro da SVZ, dados estes que foram suplementados por ensaios que demonstraram um decréscimo na taxa proliferativa e número de neuroblastos no bulbo olfatório após a utilização de antagonistas para os respectivos receptores, cujo fenótipo era restaurado após a administração do agonista (HÖGLINGER; RIZK; MURIEL; DUYCKAERTS *et al.*, 2004; KIM; WANG; COMTE; PASTRANA *et al.*, 2010).

Outros resultados mostraram um maior número de interneurônios diferenciados no bulbo olfatório e maior taxa proliferativa após o uso de PPX, um agonista de receptores D2/D3 usado no tratamento de Parkinson (WINNER; DESPLATS; HAGL; KLUCKEN *et al.*, 2009). Foi observado uma maior expressão de receptores D3 nas células de rápida proliferação (únicas células da SVZ observadas expressando esse receptor) na região ventral da V-SVZ comparado a porção dorsal (KIM; WANG; COMTE; PASTRANA *et al.*, 2010), domínio onde curiosamente foi observado a maior inervação de fibras ir-CART dentro da nossa quantificação. Outro estudo mostrou uma redução de 43% de RNAm CART no Acb após a utilização do agonista para o receptor D3 *quinpirole*, (HUNTER; JONES; VICENTIC; HUE *et al.*, 2006), dado que poderia sugerir uma manutenção da quiescência das células proliferativas C por CART.

A imunofluorescência para DARPP32 não detecta a presença concomitante de receptores D1/D2 na membrana dos neurônios estriatais. No entanto, considerando a presença de D2 nesses neurônios, ressaltamos que é mostrado na literatura (LINDSKOG; SVENNINGSSON; FREDHOLM; GREENGARD *et al.*, 1999) que a ligação da dopamina nesses receptores resulta em um decréscimo do estado fosforilado de DARPP32 e diminuição dos níveis intracelulares de AMPc. Ao que indica, o promotor CART parece responder aos níveis de AMPc (BARRETT; DAVIDSON; MORGAN, 2002; JONES; KUCHAR, 2006). Esse mecanismo também pode ser correlacionado à ativação de receptores D1, mas ainda há uma trajetória para se seguir para entender ao certo o mecanismo de ação e receptor específico responsivo ao

CART. Ao que se sabe, o CART é um elemento co-localizado com a dopamina, e que poderia tanto positiva quanto negativamente, estar envolvido ao menos indiretamente com a neurogênese.

### 6.3 CART e Vimentina

Em relação à dupla imunofluorescência com anticorpos anti-CART e anti-Vimentina, foi observado uma marcação tipicamente visível da camada endimária pela vimentina (um filamento intermediário encontrado nessas células), a qual no microscópio apresenta um aspecto de colmeia (MIRZADEH; MERKLE; SORIANO-NAVARRO; GARCIA-VERDUGO *et al.*, 2008; VIDOVIC; DAVILA; GRONOSTAJSKI; HARVEY *et al.*, 2018), exceto por uma marcação atípica observada em algumas reações, que demonstrou uma malha de longas projeções da superfície basal dessas células, de característica filamentosa, observada na porção ventral do ventrículo lateral, e se inserindo no caudado-putâme.

Sabe-se que a vimentina também serve como marcador de astrócito, mas não seria o caso desta célula, por encontrarmos marcações estritamente na superfície ventricular e de soma com morfologia característica de células endimárias (SCHNITZER; FRANKE; SCHACHNER, 1981). Além disso, Mirzadeh *et al.* (2008) excluiu a possibilidade deste anticorpo marcar astrócitos B1, os quais participam como progenitores neurais primários e ocupam a superfície endimária. No sistema nervoso, vimentina também marca células da glia radial no período embrionário (MERKLE; TRAMONTIN; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 2004; SCHNITZER; FRANKE; SCHACHNER, 1981). Essas produzem uma fibra que funciona como um trilho para migração durante esse período neurogênico, mas Jinnou *et al.* (2018) demonstrou que essas fibras radiais podem ser persistentes após injúria no período neonatal; essa observação poderia ser a resposta para a consideração de uma marcação inespecífica (JINNOU; SAWADA; KAWASE; KANEKO *et al.*, 2018).

Em nosso ensaio vimos algumas fibras ir-CART adentrando a camada endimária e se posicionando sobre as células endimárias, o que é interessante e abre o questionamento se CART é liberado naquela região e exerce alguma função na regulação da barreira hemato-liquórica. As células endimárias são células cuboides ciliadas que formam o epitélio dos

ventrículos cerebrais (DEL BIGIO, 2010; MITRO; PALKOVITS, 1981) notoriamente conhecidas por colaborar na formação do plexo corióide - responsável por sintetizar o líquido cefalorraquidiano -, de dividir o ambiente fluido com o parênquima do cérebro, participar da dispersão das moléculas sinalizadoras dentro do fluido pelos cílios apicais e na manutenção do equilíbrio osmótico (DEL BIGIO, 2010; JIMÉNEZ; DOMÍNGUEZ-PINOS; GUERRA; FERNÁNDEZ-LLEBREZ *et al.*, 2014; VIDOVIC; DAVILA; GRONOSTAJSKI; HARVEY *et al.*, 2018). Também, na V-SVZ a camada endimária mantém a estrutura e compartimentalização das demais populações dentro do nicho neurogênico, associado pela sua extremidade basal com os astrócitos B1 preservando a morfologia funcional do ambiente e sua adesão (MIRZADEH; MERKLE; SORIANO-NAVARRO; GARCIA-VERDUGO *et al.*, 2008).

Kokovay *et al* (2010) observou uma alta expressão de SDF1 (quimiocina envolvida na neuroproteção e proliferação) nas células endimárias, especulando estar envolvido na manutenção do estado quiescente ou proliferativo das células B1 dependendo da sua concentração, como também na migração de neuroblastos sustentados por vasos sanguíneos e direcionados via corrente migratória rostral até o bulbo olfatório. Ademais, foi proposto que molécula sinalizadora Noggin, expressada também pelas células endimárias, estaria envolvida na neurogênese pela ação antagonista sobre a sinalização BMP nos astrócitos B1, que quando ativa, bloqueia a via neurogênica favorecendo a gliogênese (LIM; TRAMONTIN; TREVEJO; HERRERA *et al.*, 2000).

Assim, com base nesses dados e no constante entendimento da interação das subpopulações de células dentro da V-SVZ e da possível participação das células endimárias como um agente de suporte trófico e metabólico dentro do seu nicho (DEL BIGIO, 2010), é plausível que as fibras contendo o neuropeptídeo CART inseridas dentro da V-SVZ exerçam alguma função neuromoduladora importante no contexto da neurogênese devido sua proximidade neuroanatômica.

#### **6.4 CART: análise anatofuncional e neurogênese.**

Como descrito, foi observado atividade neurogênica no período pós-natal em diversas espécies. Em roedores temos a zona subgranular (SGZ) no

giro denteado do hipocampo (ALTMAN; BAYER, 1990; ALTMAN; DAS, 1965), e a zona ventricular-subventricular (V-SVZ) subjacente aos ventrículos laterais (DOETSCH; CAILLÉ; LIM; GARCÍA-VERDUGO *et al.*, 1999).

Neste estudo, nosso foco foi a V-SVZ, e nela realizamos uma investigação quantitativa da densidade de axônios candidatos a exercer a regulação da neurogênese. Esse é um evento que resulta na produção de quatro diferentes tipos de neurônios para o bulbo olfatório (baseados em sua topografia, morfologia e neuroquímica), fato que se relaciona com a origem de seus precursores a partir de quatro diferentes domínios da V-SVZ (MERKLE; MIRZADEH; ALVAREZ-BUYLLA, 2007). Observou-se que, antes de chegar no bulbo olfatório, as populações de neuroblastos migrando pela corrente migratória rostral era heterogênea, o que culminou com a investigação e observação de uma possível diferença nas características dos interneurônios diferenciados na camada granular e periglomerular do bulbo olfatório.

Nosso estudo comparou a distribuição dos axônios ir-CART em quatro diferentes regiões quanto a sua disposição ao redor do ventrículo lateral: ventral, medial, lateral, e dorsolateral, como representado na figura 4.

Os domínios de maior interesse no campo da neurogênese são os domínios ventral, lateral e dorsolateral, pois em níveis mais anteriores, são os territórios onde foi observado a maior presença de neuroblastos, que como mencionado, formam um feixe na V-SVZ na sua face lateral, dorsalmente convergindo sob o corpo caloso, e ventralmente trilhando em direção da comissura anterior, no território do núcleo accumbens (SAWAMOTO; WICHTERLE; GONZALEZ-PEREZ; CHOLFIN *et al.*, 2006).

Sob um olhar anatômico, ainda não é totalmente compreendido a presença de neuroblastos em direção à comissura anterior, um sentido oposto à via migratória rostral, a qual acredita-se ser a única disponível em roedores para migração desses neuroblastos até o bulbo olfatório. Esses neuroblastos estão adentrando o território do Acb e ainda não sabe e/ou se teria alguma razão específica desta trajetória e sua marcação nessa região.

Como supramencionado, obtivemos a maior densidade de fibras imunorreativas no domínio medial e ventral. A quantificação no eixo rostrocaudal de fibras ir-CART apresentou uma variação nos números para cada domínio dentro do mesmo ponto craniométrico do bregma, o que

difficultou estabelecer se havia um padrão anteroposterior dessa marcação. Algumas dificuldades que poderiam ser o resultado dessa variância foram citadas, mas é possível dizer que, quanto à densitometria, os números eram significativos em comparação com os domínios lateral e dorsolateral, sublinhando sua significância nesses territórios.

O CART dentro do território do Acb é associado com a via da recompensa, e tipicamente apresenta uma grande marcação imunoistoquímica nessa região, sobretudo no AcbSh. Entretanto, nesse estudo delimitamos sua área de maneira que restringisse a região englobando a V-SVZ na região ventral do ventrículo lateral, afinando ligeiramente em direção a comissura anterior, procurando mimetizar o caminho do feixe de neuroblastos observados por imunoistoquímica.

Com base nos experimentos de Merkle et al (2012), que fez uma investigação região-específica do tipo de interneurônio diferenciado e local de origem na SVZ, foi observado que no domínio ventral da V-SVZ houve diferenciação de interneurônios tanto na região granular e periglomerular do bulbo olfatório, ambas regiões em sua maioria positivas para calbindina (CalB), acrescentando que na camada glomerular era frequente apresentarem ramificações mais profundas. Já no domínio medial da V-SVZ, a área septal (onde foi sugerido a existência de progenitores por outros autores), também foi investigada e observou-se a diferenciação para interneurônios em ambas camadas no bulbo olfatório, porém majoritariamente positivas para calretinina (CalR).

Nisso, pode-se sugerir que a marcação de fibras CART nos domínios medial e ventral da V-SVZ poderia ter algum envolvimento na neurogênese, no que tange à diferenciação dos respectivos subtipos de interneurônios no bulbo olfatório oriundos de seu domínio correspondente.

Nos outros domínios ainda eram observadas fibras, de tamanhos variáveis na porção lateral e varicosidades bem aparentes, como observadas no domínio dorsolateral. Em algumas ocasiões nenhuma fibra ir-CART era observada nessas duas regiões, a não ser alguns pontos marcados conjuntamente a artefatos, e que mesmo após a edição causavam um ruído indesejado na hora de realizar a quantificação. Esses dados não descartam a possibilidade de que as fibras ir-CART encontradas nesses domínios, mesmo

que em menor número na V-SVZ, não possam desempenhar pontualmente alguma função.

### **6.5- Considerações finais**

Acreditamos que a técnica de quantificação semiautomática cumpriu o propósito do projeto e se apresentou como uma alternativa viável e acessível, a qual pode substituir a dispendiosa, e as vezes limitada quantificação manual. Os dados obtidos representam a densitometria dentro de uma determinada área, porém não é capaz de determinar o número de axônios, uma vez que há fibras de variados comprimentos e foi obtido apenas a área ocupada pelas mesmas como um conjunto. De toda a forma, houve uma nítida diferença visual de fibras ir-CART entre os domínios ventral e medial em relação com o lateral e dorsolateral, a qual foi confirmada numericamente de maneira significativa. E idealmente, para avaliação mais minuciosa de uma tendência da densitometria das fibras, reconstruindo sua distribuição no eixo ântero-posterior, seria necessário um número maior de amostras para alguns níveis do Bregma.

Consideramos que a ocupação significativa de fibras ir-CART dentro do território V-SVZ tenha uma razão anatomofuncional, e que o neuropeptídeo CART poderia estar sendo liberado dentro desse nicho neurogênico e modulando alguma etapa na neurogênese. Outra observação que suporta essa sugestão é a presença de fibras imunorreativas fluorescentes imersas na camada endimária, onde as varicosidades das fibras nervosas poderiam estar apostas às células A, B e C residentes, as quais funcionariam como um sítio combinado com o microambiente para que o evento neurogênico acontecesse devidamente.

Ademais, sabe-se da heterogeneidade da população de neuroblastos que iniciam a migração pela RMS e que existe uma prevalência da diferenciação de um determinado subtipo de interneurônio em correlação com o domínio de origem. Assim sugerimos que o CART possa estar envolvido em alguma instância da determinação do subtipo de neurônio a ser diferenciado, sobretudo nos domínios onde foi encontrada a maior densidade de fibras imunorreativas. Com base nesses dados, a diferenciação para o interneurônio



de subtipo CalB+ na camada granular (com ramificações profundas) e periglomerular poderia ter alguma correlação com a profusa inervação de fibras CART no domínio ventral, e de CalR+ em ambas camadas com o domínio medial. Logicamente essa relação é apenas especulativa, e seria, portanto, necessário outros ensaios para corroborar a observação neuroanatômica com a sugestão fisiológica e funcional de CART nesse âmbito.

Foi observado também uma possível aposição de fibras CART com células DARPP32 positivas, as quais apresentam regiões onde a varicosidade da fibra contata o soma da célula. Somado a isso utilizamos o recurso de visão ortogonal, que confirma a visualização pontual de uma região específica em uma camada de interesse no eixo Z. Ainda assim, para uma confirmação efetiva da sinapse, seria necessário uma análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão para visualizarmos as regiões eletrodensas, indícios de eventos sinápticos entre a fibra e o soma, reforçando um possível envolvimento do CART como um participante indireto na neurogênese. Entretanto muito precisa-se saber sobre a neurogênese na fase adulta, em como os neurotransmissores, por exemplo a Dopamina, estariam envolvidos, além de mais marcadores para os diferentes receptores dopaminérgicos para uma análise mais acurada.

Mais pesquisas precisam ser realizadas sobre o peptídeo CART, o qual apresenta uma abrangência considerável em diversos núcleos no SNC, refletindo sua multifuncionalidade. Exemplos são a respeito dos receptores em que o CART é ligante e na descrição mais precisa da via bioquímica inserida para complementar sua ação fisiológica e funcional, e assim futuramente explorar o potencial terapêutico desse neuropeptídeo.

## **7- CONCLUSÃO**

- Axônios ir-CART apresentam uma densidade de inervação cerca de 5 a 10X maior nos domínios ventral e medial da V-SVZ;
- Tanto as partes mais rostrais do encéfalo, como as mais caudais apresentam as maiores densidades de inervação para os domínios ventral e medial;
- Axônios e/ou terminais ir-CART estão apostos a células ir-vimentina e ir-DARPP32.

## REFERÊNCIAS

- AHMADIAN-MOGHADAM, H.; SADAT-SHIRAZI, M. S.; ZARRINDAST, M. R. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. **Peptides**, 110, p. 56-77, 12 2018.
- ALBERTSON, D. N.; PRUETZ, B.; SCHMIDT, C. J.; KUHN, D. M. *et al.* Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. **J Neurochem**, 88, n. 5, p. 1211-1219, Mar 2004.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. **J Comp Neurol**, 301, n. 3, p. 365-381, Nov 1990.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**, 124, n. 3, p. 319-335, Jun 1965.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; KOHWI, M.; NGUYEN, T. M.; MERKLE, F. T. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 73, p. 357-365, 2008.
- BARRETT, P.; DAVIDSON, J.; MORGAN, P. CART gene promoter transcription is regulated by a cyclic adenosine monophosphate response element. **Obes Res**, 10, n. 12, p. 1291-1298, Dec 2002.
- BROG, J. S.; SALYAPONGSE, A.; DEUTCH, A. Y.; ZAHM, D. S. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. **J Comp Neurol**, 338, n. 2, p. 255-278, Dec 1993.
- CANTERAS, N. S.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; GOTO, M.; CIPOLLA-NETO, J. *et al.* The retinohypothalamic tract: comparison of axonal projection patterns from four major targets. **Brain Res Rev**, 65, n. 2, p. 150-183, Jan 2011.
- DEL BIGLIO, M. R. Ependymal cells: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, 119, n. 1, p. 55-73, Jan 2010.
- DELONG, M.; WICHMANN, T. Update on models of basal ganglia function and dysfunction. **Parkinsonism Relat Disord**, 15 Suppl 3, p. S237-240, Dec 2009.
- DIAZ, J.; RIDRAY, S.; MIGNON, V.; GRIFFON, N. *et al.* Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. **J Neurosci**, 17, n. 11, p. 4282-4292, Jun 1997.

DOETSCH, F.; CAILLÉ, I.; LIM, D. A.; GARCÍA-VERDUGO, J. M. *et al.* Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. **Cell**, 97, n. 6, p. 703-716, Jun 1999.

DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **J Neurosci**, 17, n. 13, p. 5046-5061, Jul 1997.

DOMINGUEZ, G. The CART gene: structure and regulation. **Peptides**, 27, n. 8, p. 1913-1918, Aug 2006.

DOUGLASS, J.; DAOUD, S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. **Gene**, 169, n. 2, p. 241-245, Mar 1996.

DOUGLASS, J.; MCKINZIE, A. A.; COUCEYRO, P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. **J Neurosci**, 15, n. 3 Pt 2, p. 2471-2481, Mar 1995.

DYLAG, T.; KOTLINSKA, J.; RAFALSKI, P.; PACHUTA, A. *et al.* The activity of CART peptide fragments. **Peptides**, 27, n. 8, p. 1926-1933, Aug 2006.

FAGERGREN, P.; HURD, Y. CART mRNA expression in rat monkey and human brain: relevance to cocaine abuse. **Physiol Behav**, 92, n. 1-2, p. 218-225, Sep 2007.

FIENBERG, A. A.; HIROI, N.; MERMELSTEIN, P. G.; SONG, W. *et al.* DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. **Science**, 281, n. 5378, p. 838-842, Aug 1998.

GAUTVIK, K. M.; DE LECEA, L.; GAUTVIK, V. T.; DANIELSON, P. E. *et al.* Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 16, p. 8733-8738, Aug 1996.

GRACE, A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Nat Rev Neurosci**, 17, n. 8, p. 524-532, 08 2016.

GREENGARD, P.; ALLEN, P. B.; NAIRN, A. C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. **Neuron**, 23, n. 3, p. 435-447, Jul 1999.

GRIDER, M. H.; CHEN, Q.; SHINE, H. D. Semi-automated quantification of axonal densities in labeled CNS tissue. **J Neurosci Methods**, 155, n. 2, p. 172-179, Sep 2006.

GRIDER, M. H.; MAMOUNAS, L. A.; LE, W.; SHINE, H. D. In situ expression of brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 promotes sprouting of cortical serotonergic axons following a neurotoxic lesion. **J Neurosci Res**, 82, n. 3, p. 404-412, Nov 2005.

HAEMMERLE, C. A.; CAMPOS, A. M.; BITTENCOURT, J. C. Melanin-concentrating hormone inputs to the nucleus accumbens originate from distinct hypothalamic sources and are apposed to GABAergic and cholinergic cells in the Long-Evans rat brain. **Neuroscience**, 289, p. 392-405, Mar 2015.

HUBERT, G. W.; JONES, D. C.; MOFFETT, M. C.; ROGGE, G. *et al.* CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system. **Biochem Pharmacol**, 75, n. 1, p. 57-62, Jan 2008.

HUNTER, R. G.; JONES, D.; VICENTIC, A.; HUE, G. *et al.* Regulation of CART mRNA in the rat nucleus accumbens via D3 dopamine receptors. **Neuropharmacology**, 50, n. 7, p. 858-864, Jun 2006.

HUNTER, R. G.; KUCHAR, M. J. CART peptides as targets for CNS drug development. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, 2, n. 3, p. 201-205, Jun 2003.

HÖGLINGER, G. U.; RIZK, P.; MURIEL, M. P.; DUYCKAERTS, C. *et al.* Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. **Nat Neurosci**, 7, n. 7, p. 726-735, Jul 2004.

JANZSÓ, G.; VALCZ, G.; THUMA, A.; SZOKE, B. *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide-immunopositive neuronal elements in the lateral septum: rostrocaudal distribution in the male rat. **Brain Res**, 1362, p. 40-47, Nov 2010.

JAWORSKI, J. N.; JONES, D. C. The role of CART in the reward/reinforcing properties of psychostimulants. **Peptides**, 27, n. 8, p. 1993-2004, Aug 2006.

JAWORSKI, J. N.; KOZEL, M. A.; PHILPOT, K. B.; KUCHAR, M. J. Intra-accumbal injection of CART (cocaine-amphetamine regulated transcript) peptide reduces cocaine-induced locomotor activity. **J Pharmacol Exp Ther**, 307, n. 3, p. 1038-1044, Dec 2003.

JIMÉNEZ, A. J.; DOMÍNGUEZ-PINOS, M. D.; GUERRA, M. M.; FERNÁNDEZ-LLEBREZ, P. *et al.* Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. **Tissue Barriers**, 2, p. e28426, 2014.

JINNOU, H.; SAWADA, M.; KAWASE, K.; KANEKO, N. *et al.* Radial Glial Fibers Promote Neuronal Migration and Functional Recovery after Neonatal Brain Injury. **Cell Stem Cell**, 22, n. 1, p. 128-137.e129, 01 2018.

JONES, D. C.; KUHAR, M. J. Cocaine-amphetamine-regulated transcript expression in the rat nucleus accumbens is regulated by adenylyl cyclase and the cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase a second messenger system. **J Pharmacol Exp Ther**, 317, n. 1, p. 454-461, Apr 2006.

JONGEN-RĚLO, A. L.; GROENEWEGEN, H. J.; VOORN, P. Evidence for a multi-compartmental histochemical organization of the nucleus accumbens in the rat. **J Comp Neurol**, 337, n. 2, p. 267-276, Nov 1993.

JUNG, S. K.; HONG, M. S.; SUH, G. J.; JIN, S. Y. *et al.* Association between polymorphism in intron 1 of cocaine- and amphetamine-regulated transcript gene with alcoholism, but not with bipolar disorder and schizophrenia in Korean population. **Neurosci Lett**, 365, n. 1, p. 54-57, Jul 2004.

KAMPMAN, K. M. New medications for the treatment of cocaine dependence. **Ann Ist Super Sanita**, 45, n. 2, p. 109-115, 2009.

KENNY, P. J. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. **Neuron**, 69, n. 4, p. 664-679, Feb 2011.

KIM, Y.; WANG, W. Z.; COMTE, I.; PASTRANA, E. *et al.* Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. **J Neurochem**, 114, n. 3, p. 750-760, Aug 2010.

KOYLU, E. O.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT, P. D.; KUHAR, M. J. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. **J Comp Neurol**, 391, n. 1, p. 115-132, Feb 1998.

KUHAR, M. J. CART Peptides and Drugs of Abuse: A Review of Recent Progress. **J Drug Alcohol Res**, 5, 2016.

KUHAR, M. J.; JAWORSKI, J. N.; HUBERT, G. W.; PHILPOT, K. B. *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides play a role in drug abuse and are potential therapeutic targets. **AAPS J**, 7, n. 1, p. E259-265, Sep 2005.

LAKATOS, A.; PRINSTER, S.; VICENTIC, A.; HALL, R. A. *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. **Neurosci Lett**, 384, n. 1-2, p. 198-202, 2005 Aug 12-19 2005.

LAU, J.; HERZOG, H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. **Front Neurosci**, 8, p. 313, 2014.

LENNINGTON, J. B.; POPE, S.; GOODHEART, A. E.; DROZDOWICZ, L. *et al.* Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone. **J Neurosci**, 31, n. 37, p. 13078-13087, Sep 2011.

LIM, D. A.; TRAMONTIN, A. D.; TREVEJO, J. M.; HERRERA, D. G. *et al.* Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. **Neuron**, 28, n. 3, p. 713-726, Dec 2000.

LINDSKOG, M.; SVENNINGSSON, P.; FREDHOLM, B. B.; GREENGARD, P. *et al.* Activation of dopamine D2 receptors decreases DARPP-32 phosphorylation in striatonigral and striatopallidal projection neurons via different mechanisms. **Neuroscience**, 88, n. 4, p. 1005-1008, 1999.

LUO, Y.; SHEN, H.; LIU, H. S.; YU, S. J. *et al.* CART peptide induces neuroregeneration in stroke rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, 33, n. 2, p. 300-310, Feb 2013.

MAIXNEROVÁ, J.; HLAVÁČEK, J.; BLOKESOVÁ, D.; KOWALCZYK, W. *et al.* Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. **Peptides**, 28, n. 10, p. 1945-1953, Oct 2007.

MAO, P. Potential Antidepressant Role of Neurotransmitter CART: Implications for Mental Disorders. **Depress Res Treat**, 2011, p. 762139, 2011.

MARGULES, D. L.; OLDS, J. Identical "feeding" and "rewarding" systems in the lateral hypothalamus of rats. **Science**, 135, n. 3501, p. 374-375, Feb 1962.

MENG, Q.; KIM, H. C.; OH, S.; LEE, Y. M. *et al.* Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART) Peptide Plays Critical Role in Psychostimulant-Induced Depression. **Biomol Ther (Seoul)**, 26, n. 5, p. 425-431, Sep 2018.

MEREDITH, G. E.; BALDO, B. A.; ANDREZJEWSKI, M. E.; KELLEY, A. E. The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. **Brain Struct Funct**, 213, n. 1-2, p. 17-27, Sep 2008.

MERKLE, F. T.; FUENTEALBA, L. C.; SANDERS, T. A.; MAGNO, L. *et al.* Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. **Nat Neurosci**, 17, n. 2, p. 207-214, Feb 2014.

MERKLE, F. T.; MIRZADEH, Z.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. **Science**, 317, n. 5836, p. 381-384, Jul 2007.



MERKLE, F. T.; TRAMONTIN, A. D.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 50, p. 17528-17532, Dec 2004.

MIRAGLIA DEL GIUDICE, E.; SANTORO, N.; FIUMANI, P.; DOMINGUEZ, G. *et al.* Adolescents carrying a missense mutation in the CART gene exhibit increased anxiety and depression. **Depress Anxiety**, 23, n. 2, p. 90-92, 2006.

MIRZADEH, Z.; MERKLE, F. T.; SORIANO-NAVARRO, M.; GARCIA-VERDUGO, J. M. *et al.* Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. **Cell Stem Cell**, 3, n. 3, p. 265-278, Sep 2008.

MITRO, A.; PALKOVITS, M. Morphology of the rat brain ventricles, ependyma, and periventricular structures. **Bibl Anat**, n. 21, p. 1-110, 1981.

MURPHY, K. G. Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. **Brief Funct Genomic Proteomic**, 4, n. 2, p. 95-111, Jul 2005.

NAGELOVÁ, V.; PIRNÍK, Z.; ŽELEZNÁ, B.; MALETÍNSKÁ, L. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors. **Brain Res**, 1547, p. 16-24, Feb 2014.

OBERNIER, K.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. **Development**, 146, n. 4, 02 2019.

PATI, D.; MARCINKIEWCZ, C. A.; DIBERTO, J. F.; COGAN, E. S. *et al.* Chronic intermittent ethanol exposure dysregulates a GABAergic microcircuit in the bed nucleus of the stria terminalis. **Neuropharmacology**, 168, p. 107759, May 2020.

REYNAUD, J.; CULL, G.; WANG, L.; FORTUNE, B. *et al.* Automated quantification of optic nerve axons in primate glaucomatous and normal eyes--method and comparison to semi-automated manual quantification. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 53, n. 6, p. 2951-2959, May 2012.

RHOLAM, M.; BRAKCH, N.; GERMAIN, D.; THOMAS, D. Y. *et al.* Role of amino acid sequences flanking dibasic cleavage sites in precursor proteolytic processing. The importance of the first residue C-terminal of the cleavage site. **Eur J Biochem**, 227, n. 3, p. 707-714, Feb 1995.

ROGGE, G.; JONES, D.; HUBERT, G. W.; LIN, Y. *et al.* CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. **Nat Rev Neurosci**, 9, n. 10, p. 747-758, Oct 2008.

ROGGE, M. M.; GREENWALD, M.; GOLDEN, A. Obesity, stigma, and civilized oppression. **ANS Adv Nurs Sci**, 27, n. 4, p. 301-315, 2004 Oct-Dec 2004.

SALGADO, S.; KAPLITT, M. G. The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. **Stereotact Funct Neurosurg**, 93, n. 2, p. 75-93, 2015.

SARKAR, S.; WITTMANN, G.; FEKETE, C.; LECHAN, R. M. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Brain Res**, 999, n. 2, p. 181-192, Mar 2004.

SATHYANESAN, A.; OGURA, T.; LIN, W. Automated measurement of nerve fiber density using line intensity scan analysis. **J Neurosci Methods**, 206, n. 2, p. 165-175, 2012.

SATO, Y.; NAKAJIMA, S.; SHIRAGA, N.; ATSUMI, H. *et al.* Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images. **Med Image Anal**, 2, n. 2, p. 143-168, Jun 1998.

SAWAMOTO, K.; WICHTERLE, H.; GONZALEZ-PEREZ, O.; CHOLFIN, J. A. *et al.* New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. **Science**, 311, n. 5761, p. 629-632, Feb 2006.

SCHNITZER, J.; FRANKE, W. W.; SCHACHNER, M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. **J Cell Biol**, 90, n. 2, p. 435-447, Aug 1981.

SILVA, A. P.; MARTINS, T.; BAPTISTA, S.; GONÇALVES, J. *et al.* Brain injury associated with widely abused amphetamines: neuroinflammation, neurogenesis and blood-brain barrier. **Curr Drug Abuse Rev**, 3, n. 4, p. 239-254, Dec 2010.

SMEDH, U.; SCOTT, K. A.; MORAN, T. H. Fourth ventricular CART peptide induces c-fos in the area postrema and nucleus of the solitary tract via a CRF-receptor dependent mechanism. **Neurosci Lett**, 609, p. 124-128, Nov 2015.

SMITH, Y.; KOYLU, E. O.; COUCEYRO, P.; KUCHAR, M. J. Ultrastructural localization of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides in the nucleus accumbens of monkeys. **Synapse**, 27, n. 1, p. 90-94, Sep 1997.

SUBHEDAR, N. K.; NAKHATE, K. T.; UPADHYA, M. A.; KOKARE, D. M. CART in the brain of vertebrates: circuits, functions and evolution. **Peptides**, 54, p. 108-130, Apr 2014.

TANG, W. X.; FASULO, W. H.; MASH, D. C.; HEMBY, S. E. Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. **J Neurochem**, 85, n. 4, p. 911-924, May 2003.

TONG, C. K.; CHEN, J.; CEBRIÁN-SILLA, A.; MIRZADEH, Z. *et al.* Axonal control of the adult neural stem cell niche. **Cell Stem Cell**, 14, n. 4, p. 500-511, Apr 2014.

UPADHYA, M. A.; NAKHATE, K. T.; KOKARE, D. M.; SINGH, U. *et al.* CART peptide in the nucleus accumbens shell acts downstream to dopamine and mediates the reward and reinforcement actions of morphine. **Neuropharmacology**, 62, n. 4, p. 1823-1833, Mar 2012.

VAN KAMPEN, J. M.; HAGG, T.; ROBERTSON, H. A. Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. **Eur J Neurosci**, 19, n. 9, p. 2377-2387, May 2004.

VIDOVIC, D.; DAVILA, R. A.; GRONOSTAJSKI, R. M.; HARVEY, T. J. *et al.* Transcriptional regulation of ependymal cell maturation within the postnatal brain. **Neural Dev**, 13, n. 1, p. 2, 02 2018.

WINNER, B.; DESPLATS, P.; HAGL, C.; KLUCKEN, J. *et al.* Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. **Exp Neurol**, 219, n. 2, p. 543-552, Oct 2009.

WISE, R. A. Forebrain substrates of reward and motivation. **J Comp Neurol**, 493, n. 1, p. 115-121, Dec 2005.

YANIK, T.; DOMINGUEZ, G.; KUCHAR, M. J.; DEL GIUDICE, E. M. *et al.* The Leu34Phe ProCART mutation leads to cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) deficiency: a possible cause for obesity in humans. **Endocrinology**, 147, n. 1, p. 39-43, Jan 2006.

YERMOLAIEVA, O.; CHEN, J.; COUCEYRO, P. R.; HOSHI, T. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> signaling in hippocampal neurons. **J Neurosci**, 21, n. 19, p. 7474-7480, Oct 2001.

YU, C.; ZHOU, X.; FU, Q.; PENG, Q. *et al.* A New Insight into the Role of CART in Cocaine Reward: Involvement of CaMKII and Inhibitory G-Protein Coupled Receptor Signaling. **Front Cell Neurosci**, 11, p. 244, 2017.

ZAHM, D. S.; BROG, J. S. On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. **Neuroscience**, 50, n. 4, p. 751-767, Oct 1992.

ZAREI, K.; SCHEETZ, T. E.; CHRISTOPHER, M.; MILLER, K. *et al.* Automated Axon Counting in Rodent Optic Nerve Sections with AxonJ. **Sci Rep**, 6, p. 26559, 05 2016.

ZHANG, M.; HAN, L.; XU, Y. Roles of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the central nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 39, n. 6, p. 586-592, Jun 2012.